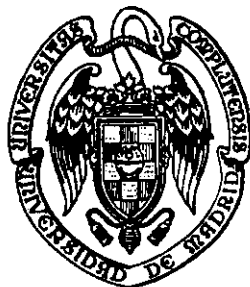


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DPTO. BIOLOGÍA VEGETAL I**  
**(CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL)**



**ESTUDIO DE LA ACCIÓN DESFOLIANTE DE EPÍFITOS SOBRE**  
**ESPECIES DE *QUERCUS***



x-53-367147-6

**TESIS DOCTORAL**

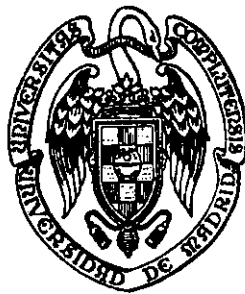
**KHALID BOUAID**

**Madrid, 1999.**

**23054**

**Khalid Bouaid**

**ESTUDIO DE LA ACCIÓN DESFOLIANTE DE EPÍFITOS SOBRE  
ESPECIES DE *QUERCUS***



**Director: Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba**  
**Catedrático de Fisiología Vegetal de**  
**la Facultad de Ciencias Biológicas**

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Dpto. Biología Vegetal I**  
**(Cátedra de Fisiología Vegetal)**  
**Madrid, 1999.**



**Trabajo realizado en la Cátedra de  
Fisiología Vegetal del Departamento de  
Biología Vegetal I, de la Facultad de Ciencias  
Biológicas, de la Universidad Complutense, que se  
presenta para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas.**

**Madrid, Febrero de 1999**

**Fdo.: Khalid Bouaid**

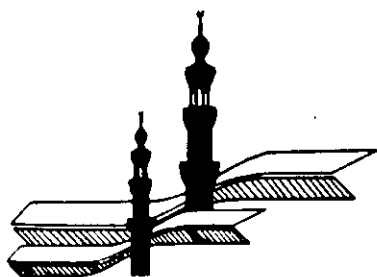
Handwritten signature of Khalid Bouaid, consisting of the letters 'KBP' above a horizontal line, and 'ma' below it, followed by a period.

**Conforme, el Director de la Tesis**

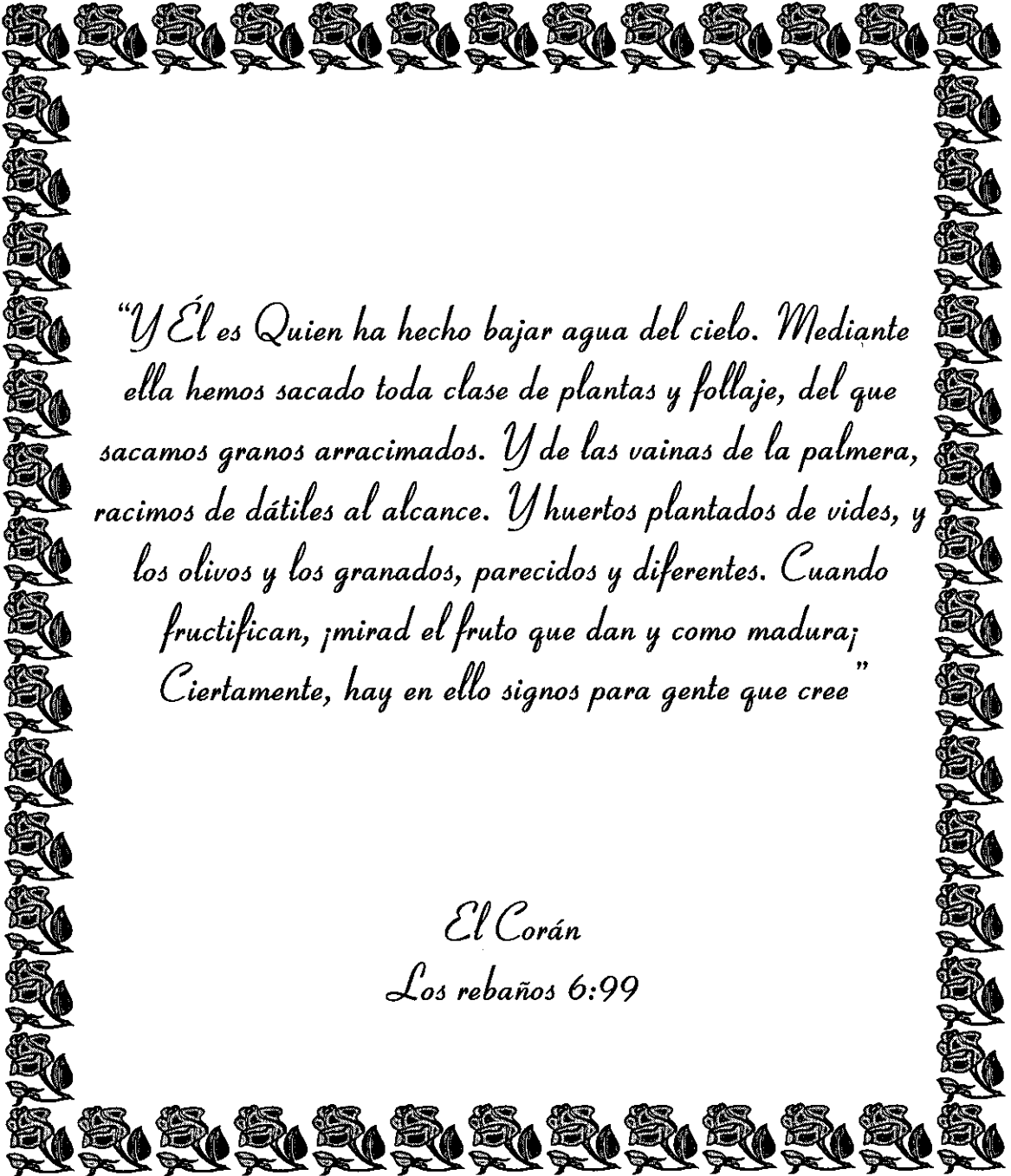
Handwritten signature of Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba, featuring a stylized 'C' and 'V' followed by 'Córdoba'.

**Fdo.: Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba.**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

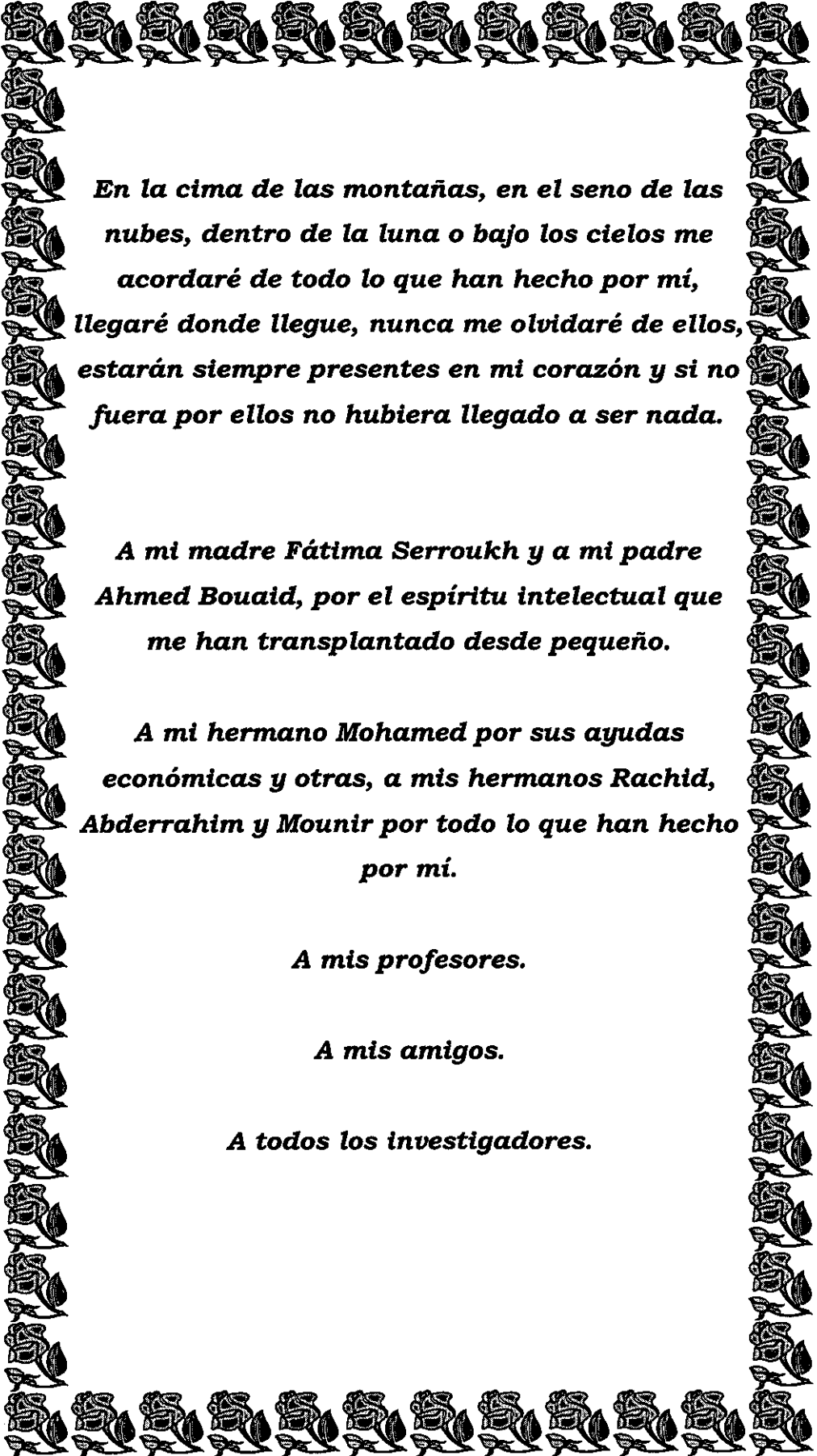




A decorative border made of repeating floral and leaf motifs surrounds the text. The motifs are stylized, with leaves pointing upwards and flowers or buds in the center of each segment.

*“Y Él es Quien ha hecho bajar agua del cielo. Mediante ella hemos sacado toda clase de plantas y follaje, del que sacamos granos arracimados. Y de las vainas de la palmera, racimos de dátiles al alcance. Y huertos plantados de vides, y los olivos y los granados, parecidos y diferentes. Cuando fructifican, ¡mirad el fruto que dan y como madura; Ciertamente, hay en ello signos para gente que cree”*

*El Corán  
Los rebaños 6:99*

A decorative border made of repeating floral and leaf motifs surrounds the text.

*En la cima de las montañas, en el seno de las  
nubes, dentro de la luna o bajo los cielos me  
acordaré de todo lo que han hecho por mí,  
llegaré donde llegue, nunca me olvidaré de ellos,  
estarán siempre presentes en mi corazón y si no  
fuera por ellos no hubiera llegado a ser nada.*

*A mi madre Fátima Serroukh y a mi padre  
Ahmed Bouaid, por el espíritu intelectual que  
me han transplantado desde pequeño.*

*A mi hermano Mohamed por sus ayudas  
económicas y otras, a mis hermanos Rachid,  
Abderrahim y Mounir por todo lo que han hecho  
por mí.*

*A mis profesores.*

*A mis amigos.*

*A todos los investigadores.*



## **AGRADECIMIENTOS**

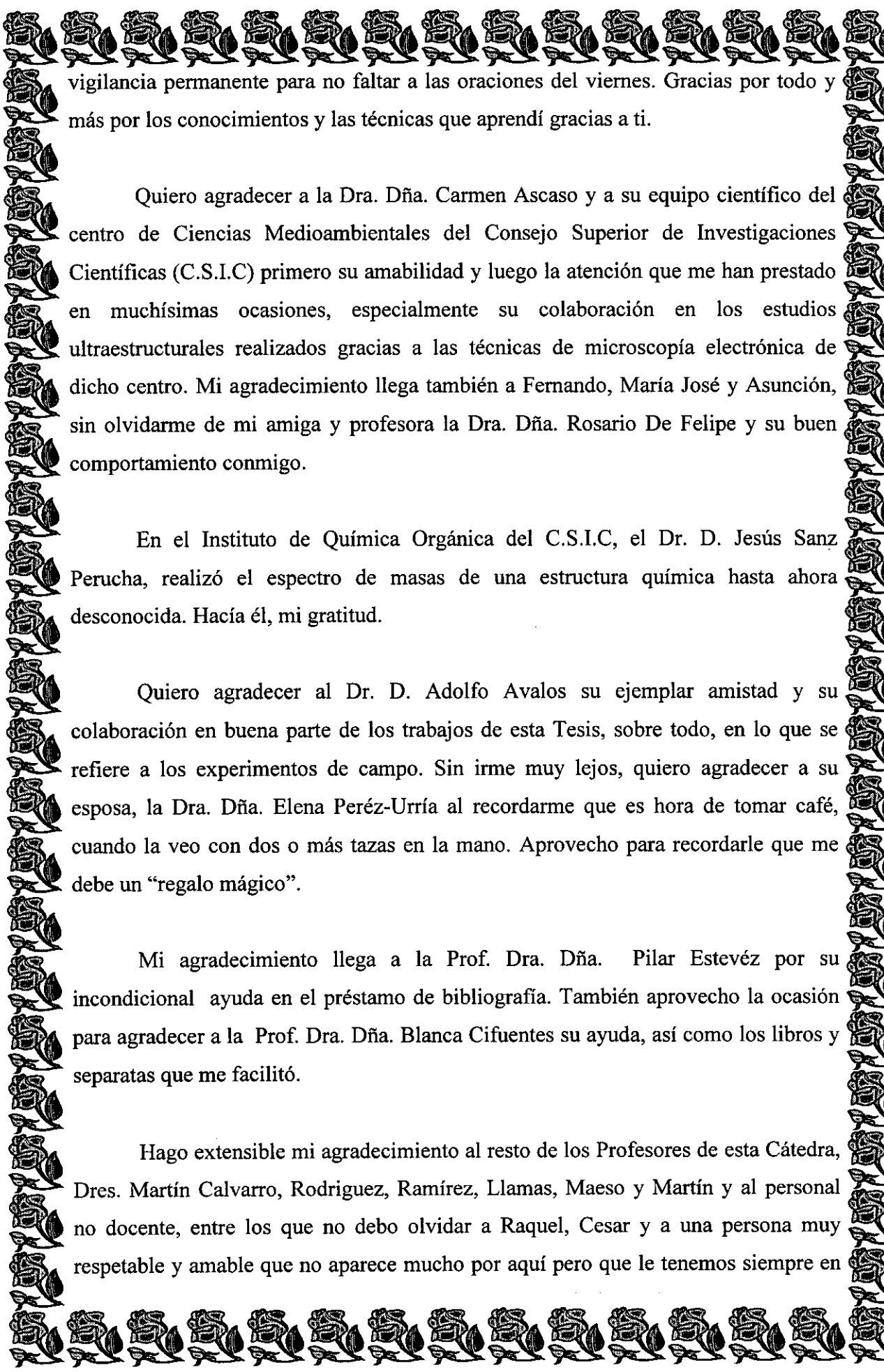
\*\*\*\*\*

*Antes de todo quiero dar las gracias a Dios por darme el poder suficiente para superar todos los obstáculos y poder hacer esta Tesis a pesar de las condiciones económicas y de otro tipo.*

Esta Tesis Doctoral es el fruto de un árbol que se plantó hace unos años y ha ido creciendo hasta alcanzar su madurez, la cual se refleja en sus páginas coloreadas. Sin embargo, para que un árbol tenga este aspecto ha debido poseer unas raíces muy profundas, que le permitieran obtener diferentes alimentos para unirlos en una tarea común absolutamente silenciosa y fructífera. Presento así el trabajo y el esfuerzo de todas las personas que, como los nutrientes en cuestión, me han ayudado a elaborar esta Tesis ya que sin sus aportaciones el árbol no hubiera superado sus primeros días. A esas personas me gustaría dedicarles unas palabras que expresaran mi profundo agradecimiento.

En primer lugar, debo referirme al nutriente que ha sido la clave del desarrollo de este árbol. Esta persona me ofreció una llave que me facilitó el acceso a un mundo lleno de conocimiento, sabiduría y curiosidad. Con esa llave pude abrir muchas puertas conociendo cada vez cosas nuevas y gente nueva que me aportaron y me siguen aportando ideas. Esta persona es mi director el Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba. Gracias, jefe, no sólo por la llave simbólica sino también por la libertad que siempre me has dado para planificar y orientar de un modo u otro todos los trabajos de la Tesis.

Mi sincero agradecimiento a la Prof. Dra. Dña. María Estrella Legaz (Maestra de HPLC) por su inestimable ayuda como profesora y amiga, y por las extensas conversaciones que hemos tenido a lo largo de estos años las cuales me han aportado muchísimas cosas; la más importante, el ejemplo de tolerancia entre personas con la misma formación científica pero de culturas y costumbres diferentes que deben formar una parte inseparable de nuestra vida. Muchas gracias también por su



vigilancia permanente para no faltar a las oraciones del viernes. Gracias por todo y más por los conocimientos y las técnicas que aprendí gracias a ti.

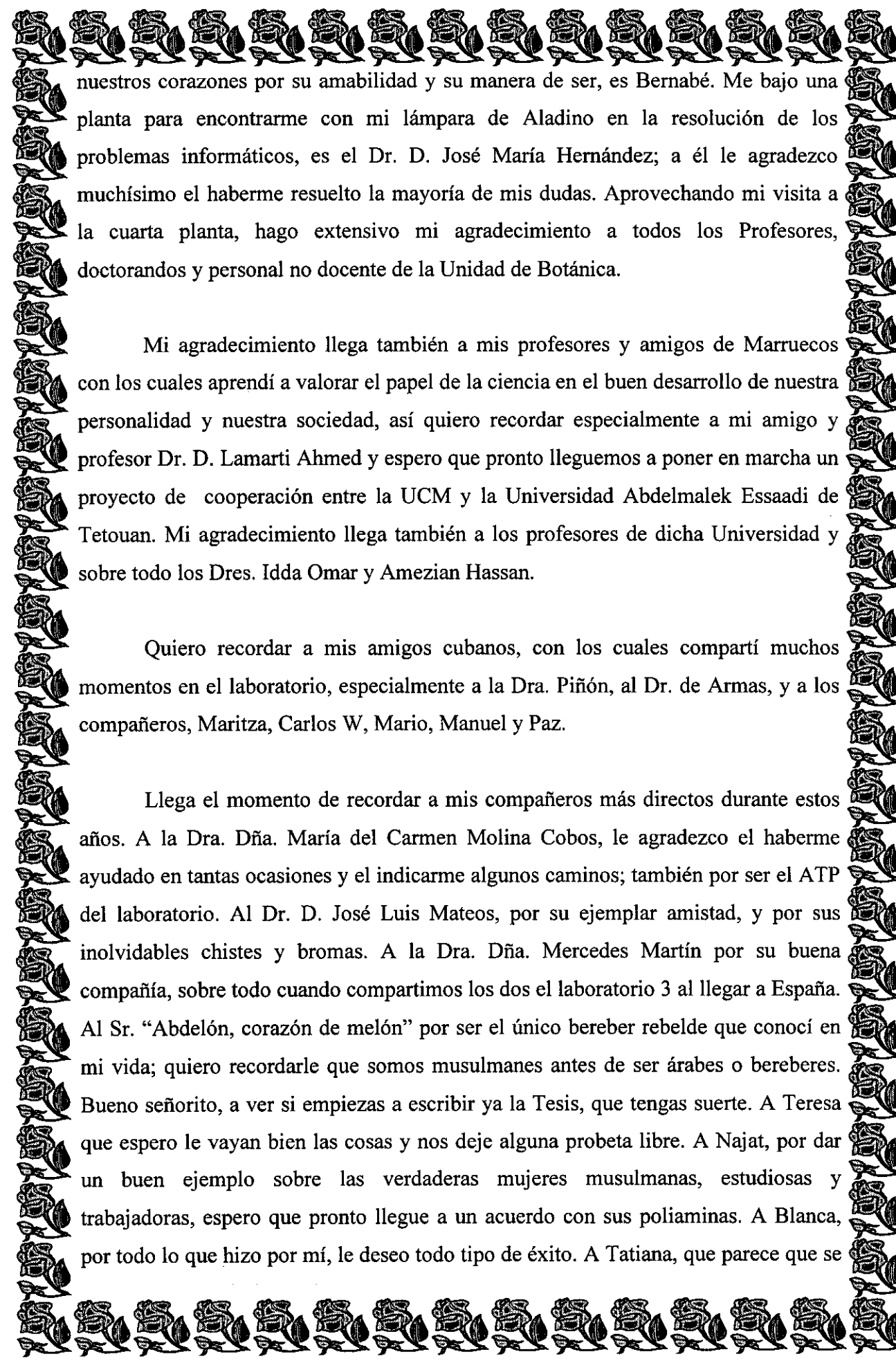
Quiero agradecer a la Dra. Dña. Carmen Ascaso y a su equipo científico del centro de Ciencias Medioambientales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C) primero su amabilidad y luego la atención que me han prestado en muchísimas ocasiones, especialmente su colaboración en los estudios ultraestructurales realizados gracias a las técnicas de microscopía electrónica de dicho centro. Mi agradecimiento llega también a Fernando, María José y Asunción, sin olvidarme de mi amiga y profesora la Dra. Dña. Rosario De Felipe y su buen comportamiento conmigo.

En el Instituto de Química Orgánica del C.S.I.C, el Dr. D. Jesús Sanz Perucha, realizó el espectro de masas de una estructura química hasta ahora desconocida. Hacía él, mi gratitud.

Quiero agradecer al Dr. D. Adolfo Avalos su ejemplar amistad y su colaboración en buena parte de los trabajos de esta Tesis, sobre todo, en lo que se refiere a los experimentos de campo. Sin irme muy lejos, quiero agradecer a su esposa, la Dra. Dña. Elena Pérez-Urría al recordarme que es hora de tomar café, cuando la veo con dos o más tazas en la mano. Aprovecho para recordarle que me debe un “regalo mágico”.

Mi agradecimiento llega a la Prof. Dra. Dña. Pilar Estevéz por su incondicional ayuda en el préstamo de bibliografía. También aprovecho la ocasión para agradecer a la Prof. Dra. Dña. Blanca Cifuentes su ayuda, así como los libros y separatas que me facilitó.

Hago extensible mi agradecimiento al resto de los Profesores de esta Cátedra, Dres. Martín Calvarro, Rodriguez, Ramírez, Llamas, Maeso y Martín y al personal no docente, entre los que no debo olvidar a Raquel, Cesar y a una persona muy respetable y amable que no aparece mucho por aquí pero que le tenemos siempre en

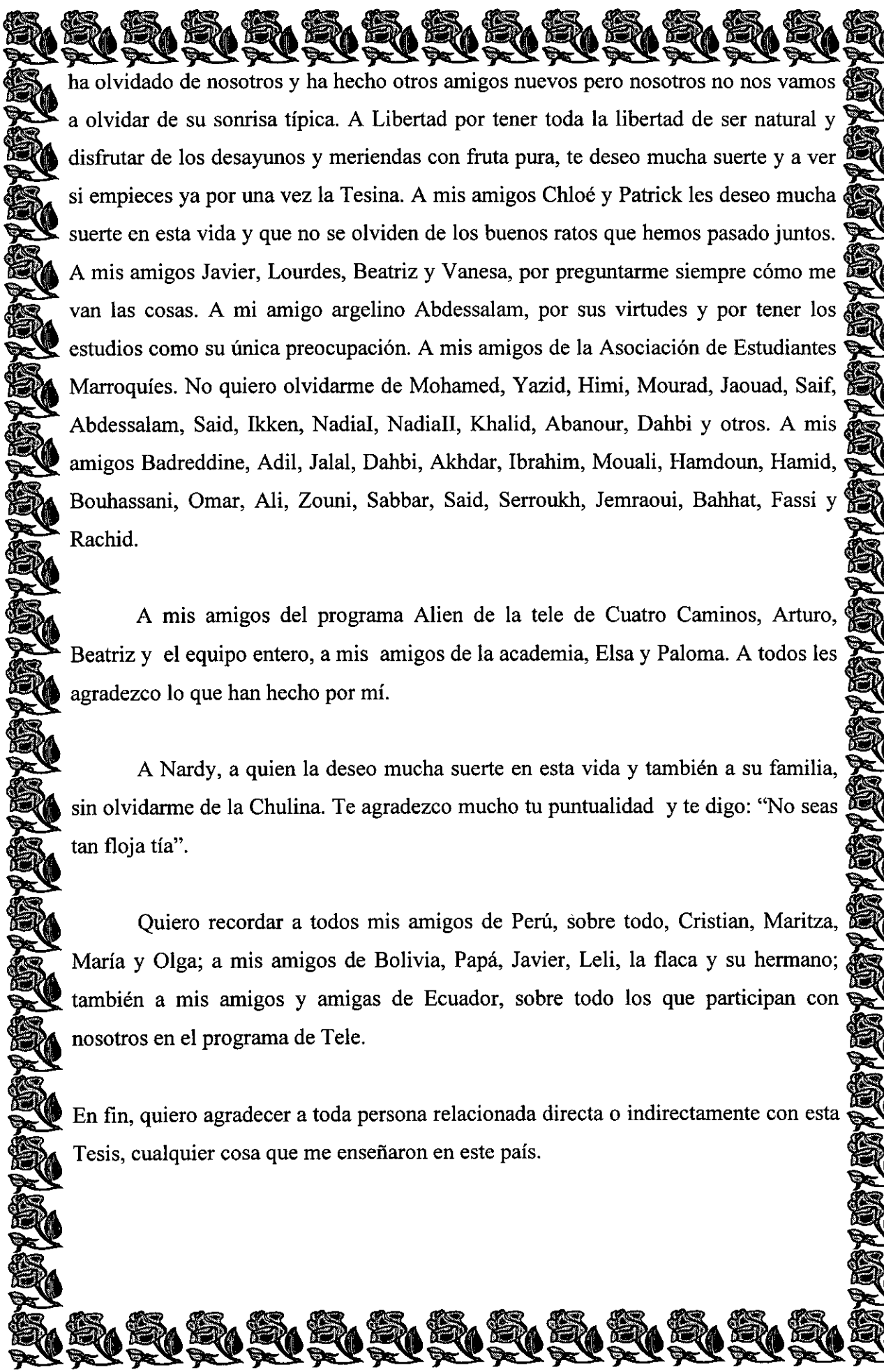
A decorative border of stylized leaves and flowers surrounds the text on all four sides.

nuestros corazones por su amabilidad y su manera de ser, es Bernabé. Me bajo una planta para encontrarme con mi lámpara de Aladino en la resolución de los problemas informáticos, es el Dr. D. José María Hernández; a él le agradezco muchísimo el haberme resuelto la mayoría de mis dudas. Aprovechando mi visita a la cuarta planta, hago extensivo mi agradecimiento a todos los Profesores, doctorandos y personal no docente de la Unidad de Botánica.

Mi agradecimiento llega también a mis profesores y amigos de Marruecos con los cuales aprendí a valorar el papel de la ciencia en el buen desarrollo de nuestra personalidad y nuestra sociedad, así quiero recordar especialmente a mi amigo y profesor Dr. D. Lamarti Ahmed y espero que pronto lleguemos a poner en marcha un proyecto de cooperación entre la UCM y la Universidad Abdelmalek Essaadi de Tetouan. Mi agradecimiento llega también a los profesores de dicha Universidad y sobre todo los Dres. Idda Omar y Amezian Hassan.

Quiero recordar a mis amigos cubanos, con los cuales compartí muchos momentos en el laboratorio, especialmente a la Dra. Piñón, al Dr. de Armas, y a los compañeros, Maritza, Carlos W, Mario, Manuel y Paz.

Llega el momento de recordar a mis compañeros más directos durante estos años. A la Dra. Dña. María del Carmen Molina Cobos, le agradezco el haberme ayudado en tantas ocasiones y el indicarme algunos caminos; también por ser el ATP del laboratorio. Al Dr. D. José Luis Mateos, por su ejemplar amistad, y por sus inolvidables chistes y bromas. A la Dra. Dña. Mercedes Martín por su buena compañía, sobre todo cuando compartimos los dos el laboratorio 3 al llegar a España. Al Sr. "Abdelón, corazón de melón" por ser el único bereber rebelde que conocí en mi vida; quiero recordarle que somos musulmanes antes de ser árabes o bereberes. Bueno señorito, a ver si empiezas a escribir ya la Tesis, que tengas suerte. A Teresa que espero le vayan bien las cosas y nos deje alguna probeta libre. A Najat, por dar un buen ejemplo sobre las verdaderas mujeres musulmanas, estudiosas y trabajadoras, espero que pronto llegue a un acuerdo con sus poliaminas. A Blanca, por todo lo que hizo por mí, le deseo todo tipo de éxito. A Tatiana, que parece que se



ha olvidado de nosotros y ha hecho otros amigos nuevos pero nosotros no nos vamos a olvidar de su sonrisa típica. A Libertad por tener toda la libertad de ser natural y disfrutar de los desayunos y meriendas con fruta pura, te deseo mucha suerte y a ver si empiezas ya por una vez la Tesina. A mis amigos Chloé y Patrick les deseo mucha suerte en esta vida y que no se olviden de los buenos ratos que hemos pasado juntos. A mis amigos Javier, Lourdes, Beatriz y Vanesa, por preguntarme siempre cómo me van las cosas. A mi amigo argelino Abdessalam, por sus virtudes y por tener los estudios como su única preocupación. A mis amigos de la Asociación de Estudiantes Marroquíes. No quiero olvidarme de Mohamed, Yazid, Himi, Mourad, Jaouad, Saif, Abdessalam, Said, Ikken, NadiaI, NadiaII, Khalid, Abanour, Dahbi y otros. A mis amigos Badreddine, Adil, Jalal, Dahbi, Akhdar, Ibrahim, Mouali, Hamdoun, Hamid, Bouhassani, Omar, Ali, Zouni, Sabbar, Said, Serroukh, Jemraoui, Bahhat, Fassi y Rachid.

A mis amigos del programa Alien de la tele de Cuatro Caminos, Arturo, Beatriz y el equipo entero, a mis amigos de la academia, Elsa y Paloma. A todos les agradezco lo que han hecho por mí.

A Nardy, a quien la deseo mucha suerte en esta vida y también a su familia, sin olvidarme de la Chulina. Te agradezco mucho tu puntualidad y te digo: “No seas tan floja tía”.

Quiero recordar a todos mis amigos de Perú, sobre todo, Cristian, Maritza, María y Olga; a mis amigos de Bolivia, Papá, Javier, Leli, la flaca y su hermano; también a mis amigos y amigas de Ecuador, sobre todo los que participan con nosotros en el programa de Tele.

En fin, quiero agradecer a toda persona relacionada directa o indirectamente con esta Tesis, cualquier cosa que me enseñaron en este país.

- ADN: *ácido desoxirribonucleico.*
- AIA: *ácido-3-indol acético.*
- ATP: *adenosina-5-trifosfato.*
- CP1: *complejo clorofila-proteína I que incluye el P700.*
- CP4: *complejo clorofila-proteína IV que probablemente incluye el P680.*
- DCMU: *N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetil urea.*
- DCPIP: *2,6-diclorofenol indofenol.*
- EF: *cara de fractura ectoplásmica.*
- ES: *superficie ectoplásmica natural.*
- HPLC: *cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).*
- IR: *infrarrojo*
- LHCI: *complejo colector ligado a PSI.*
- LHCP: *complejo colector (Light-Harvesting-Chlorophyll a/b Protein complexes)*
- MEB: *microscopía electrónica de barrido.*
- MET: *microscopía electrónica de transmisión.*
- MS: *espectrometría de masas.*
- NADPH: *fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato reducido.*
- P680: *pigmento fotoactivo del fotosistema II.*
- P700: *pigmento fotoactivo del fotosistema I.*
- PAGE: *Electroforesis en gel de poliacrilamida (PolyAcrylamide Gel Electroforésis).*
- PF: *cara de fractura protoplásmica.*
- PS: *superficie protoplásmica natural.*
- PSI: *fotosistema I.*
- PSII: *fotosistema II.*
- Q<sub>B</sub>: *plastoquinona B.*
- TLC: *cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography).*

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LOS LÍQUENES .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Consideraciones generales .....	2
1.1.2. Repartición y número de especies .....	2
1.1.3. Historia del liquen .....	2
1.1.4. Definición de un liquen .....	9
1.1.5. Líquenes epífitos.....	9
1.1.5.1. Ecología y ecofisiología de la implantación del epífito .....	9
1.1.5.2. Sustancias líquénicas.....	11
1.1.5.2.1. Denominación y naturaleza de sustancias líquénicas.....	11
1.1.5.2.2. Localización y concentración.....	12
1.1.5.2.3. Biogénesis de las sustancias líquénicas.....	13
1.1.5.2.4. Importancia de las sustancias líquénicas.....	13
1.1.5.3. Relación del liquen con el fitóforo.....	15
1.1.5.3.1. Del epifitismo al parasitismo.....	15
1.1.5.3.2. Penetración del epífito en su sustrato.....	16
1.1.5.3.3. Interacciones nutricionales entre líquenes epífitos y su fitóforo.....	18
1.1.5.4. Liquen epífito: <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach .....	19
1.1.5.4.1 Características diferenciales.....	19
1.1.5.4.2. Sustancias líquénicas características .....	20
1.1.5.4.3. Relación con el fitóforo.....	20
<b>1.2. FISIOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA DESFOLIACIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. MECANISMO DE LA FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS SUPERIORES .....</b>	<b>26</b>
1.3.1. El cloroplasto funcional .....	27
1.3.1.1. Constitución de fotosistemas para fotosíntesis oxigénica.....	28
1.3.1.2. Topografía funcional de las lamelas tilacoidales .....	31
1.3.1.3. Clorofilas de plantas superiores .....	33
<b>1.4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Consideraciones generales y desarrollo histórico .....	34
1.4.2. Auxina.....	35
1.4.2.1. Descubrimiento y localización.....	35
1.4.2.2. Relación entre estructura y actividad .....	36
1.4.2.3. Biosíntesis en plantas superiores.....	36
1.4.2.4. Los conjugados de la auxina .....	38
1.4.2.4.1. Descubrimiento de los conjugados de auxina .....	38
1.4.2.4.2. Hidrólisis de los conjugados de la auxina .....	39
1.4.2.5. Oxidación de la auxina.....	40
1.4.2.5.1. Oxidación descarboxilativa .....	41
1.4.2.5.2. Oxidación no descarboxilativa .....	42



<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 SELECCIÓN DE ORGANISMOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE <i>EVERNIA PRUNASTRI</i> (L.) ACH.....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Análisis del extracto acetónico .....	48
3.2.1.1. Cromatografía en capa fina.....	48
3.2.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución.....	49
3.2.1.3. Espectrometría de masas .....	49
<b>3.3. VISUALIZACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE <i>EVERNIA PRUNASTRI</i> POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN FITOQUÓMICA DE HOJAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM.....</b>	<b>50</b>
3.4.1. Test para fenoles y taninos .....	50
3.4.2. Test para antocianinas, antocianidinas y flavonoides.....	50
3.4.3. Test para alcaloides .....	51
3.4.4. Test para esteroides, triterpenoides y saponinas.....	51
<b>3.5. VARIACIÓN DE LOS FENOLES EN LA SAVIA XILEMÁTICA DEL FITÓFORO .....</b>	<b>52</b>
3.5.1. Técnicas de cromatografía en capa fina .....	53
3.5.2. Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución .....	53
<b>3.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LAS RAMAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM.....</b>	<b>53</b>
<b>3.7. MEDIDA DE LA REACCIÓN DE HILL.....</b>	<b>54</b>
3.7.1. Obtención de cloroplastos .....	54
3.7.2. Ensayos de la actividad fotolítica .....	54
3.7.3. Medida de clorofilas .....	55
<b>3.8. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS CAUSADA POR LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS .....</b>	<b>55</b>
3.8.1. Valoración de la degradación de clorofilas por espectrofotometría .....	55
3.8.2. Valoración de la degradación de clorofilas por HPLC.....	56
3.8.2.1. Técnicas de cromatografía de alta resolución .....	56

3.8.2.2. Estudio de la penetración de fenoles en el interior del cloroplasto .....	57
3.8.2.3. Estudio de la degradación de clorofilas y cuantificación de productos.....	57
<b>3.9. OBSERVACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS HOJAS DE RAMAS SIN Y CON UNA DENSA COBERTURA LIQUÉNICA .....</b>	<b>58</b>
3.9.1. Técnicas de microscopía electrónica para el estudio del efecto de las sustancias liquénicas sobre los cloroplastos .....	58
3.9.1.1. Cortes ultrafinos .....	58
3.9.1.1.1. Fijación.....	58
3.9.1.1.2. Deshidratación.....	59
3.9.1.1.3. Inclusión .....	59
3.9.1.1.4. Ultramicrotomía .....	60
3.9.1.1.5. Tinción .....	60
3.9.2. Toma de fotografías .....	60
3.9.2.1. Análisis de imagen .....	60
<b>3.10. CONDICIONES DE TRATAMIENTO DE LAS YEMAS DE QUERCUS ROTUNDIFOLIA LAM. POR AUXINA EXÓGENA .....</b>	<b>61</b>
<b>3.11. ANÁLISIS Y VALORACIÓN DE AUXINA EN YEMAS CON Y SIN TRATAMIENTO POR AUXINAS EXÓGENAS .....</b>	<b>61</b>
3.11.1. Extracción de auxina .....	61
3.11.2. Técnicas de TLC .....	62
3.11.3. Purificación de la auxina.....	62
3.11.4. Técnicas de espectrofotometría.....	62
3.11.5. Técnicas de HPLC.....	63
<b>3.12. ANÁLISIS DEL CONJUGADO AUXINA-SUSTANCIA LIQUÉNICA POR HPLC.....</b>	<b>63</b>
<b>3.13. ANÁLISIS DE LA INCUBACIÓN DE LA AUXINA CON PEROXIDASA CON Y SIN PRESENCIA DE ÁCIDO ÚSNICO POR HPLC.....</b>	<b>63</b>
<b>3.14. OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE PARMELIA HYPOLEUCINA (J.) STEIN. ....</b>	<b>64</b>
3.14.1. Análisis del extracto acetónico .....	64
3.14.1.1. Técnicas de cromatografía en capa fina.....	64
3.14.1.2. Técnicas de cromatografía bidimensional .....	65
3.14.1.3. Técnicas de cromatografía de alta resolución.....	65

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE <i>EVERNIA PRUNASTRI</i>.....</b>	<b>68</b>
4.1.1. Cromatografía en capa fina .....	68
4.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución .....	68
4.1.3. Microscopía electrónica de barrido .....	71
4.1.4. Espectrometría de masas .....	71
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE HOJAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>71</b>
<b>4.3. VARIACIÓN ANUAL DE FENOLES EN EL XILEMA DE RAMAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>84</b>
<b>4.4. APLICACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS EXÓGENAS A CORTES DE RAMAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>89</b>
<b>4.5. PENETRACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>89</b>
<b>4.6. MEDIDA DE LA REACCIÓN DE HILL EN HOJAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>91</b>
<b>4.7. DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS Y CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>4.8. ESTUDIO MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE LAS HOJAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. ....</b>	<b>98</b>
4.8.1. Alteración de la estructura del cloroplasto por sustancias liquénicas.....	99
4.8.2. Alteración de la organización de tilacoides por sustancias liquénicas.....	99
<b>4.9. APLICACIÓN DE AUXINAS EXÓGENAS A LAS YEMAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. CON COBERTURA LIQUÉNICA .....</b>	<b>115</b>
<b>4.10. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE AUXINAS EN YEMAS CON Y SIN TRATAMIENTO CON AUXINAS EXÓGENAS.....</b>	<b>116</b>
4.10.1. Detección de auxina por cromatografía en capa fina .....	116
4.10.2. Espectrofotometría .....	116
4.10.3. Cromatografía líquida de alta resolución .....	116

4.11. VARIACIÓN MENSUAL DE AUXINAS EN YEMAS Y RAMAS DE <i>QUERCUS ROTUNDIFOLIA</i> LAM. CON Y SIN UNA COBERTURA LIQUÉNICA .....	116
4.12. CONJUGACIÓN DE AUXINA Y ÁCIDO ÚSNICO TRAS SU INCUBACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	117
4.13. INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LA AUXINA POR PEROXIDASA EN PRESENCIA DEL ÁCIDO ÚSNICO.....	138
4.14. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE <i>PARMELIA HYPOLEUCINA</i> (J.) STEIN. ....	138
5. <i>DISCUSIÓN</i> .....	146
6. <i>CONCLUSIONES</i> .....	161
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	165

<b>Fig. 1:</b> Biogénesis de sustancias líquénicas.....	14
<b>Fig. 2:</b> Sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	21
<b>Fig. 3:</b> Rutas de síntesis del ácido indol-3-acético a partir del triptófano.....	37
<b>Fig. 4:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. sin (A) y con una densa (B) población líquénica, principalmente de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	67
<b>Fig. 5:</b> Proporción de las sustancias líquénicas en el talo de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	73
<b>Fig. 6:</b> <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. Detalle de las sustancias líquénicas de la médula próximas al córtex superior .....	74
<b>Fig. 7:</b> <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. Detalle del córtex superior. ....	75
<b>Fig. 8:</b> <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. Detalle de las sustancias líquénicas de la médula cercana al córtex inferior. ....	76
<b>Fig. 9:</b> <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. Detalle de la médula. ....	77
<b>Fig. 10:</b> Espectro de masas de la sustancia de $R_f$ 0,19 en silicagel 60 G .....	78
<b>Fig. 11:</b> Estructura química propuesta para el dímero del ácido evérnico y estructura química del ácido disolorínico. ....	79
<b>Fig. 12:</b> Estructuras químicas propuestas como interpretación de las señales m/z de los diferentes fragmentos del dímero del ácido evérnico obtenidos por espectrometría de masas.....	80
<b>Fig. 13:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> . Análisis por TLC del xilema de ramas con una densa población del líquen epífito <i>Evernia prunastri</i> .....	86
<b>Fig. 14:</b> Variación mensual del ácido evérnico en ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> con líquenes epífitos .....	87
<b>Fig. 15:</b> Variación mensual del ácido úsnico en ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> con líquenes epífitos. ....	88
<b>Fig. 16:</b> Permeabilidad de la membrana cloroplástica de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> a las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> . ....	92

<b>Fig. 17:</b> Máximos de absorbancia de clorofila de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	93
<b>Fig. 18:</b> Medida de la concentración de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> procedentes de hojas pertenecientes a ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	94
<b>Fig. 19:</b> Liberación de oxígeno, por la reacción de Hill, de cloroplastos aislados de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	95
<b>Fig. 20:</b> Reacción de Hill en cloroplastos de hojas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	96
<b>Fig. 21:</b> Degradación de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> causada por el ácido úsnico y HCl. ....	101
<b>Fig. 22:</b> Degradación de clorofila <i>a</i> causada por las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	102
<b>Fig. 23:</b> Degradación de clorofila <i>b</i> causada por las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	103
<b>Fig. 24:</b> Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. causada por ácido úsnico. ....	104
<b>Fig. 25:</b> Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. causada por ácido evérnico ....	105
<b>Fig. 26:</b> Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. causada por atranorina. ....	106
<b>Fig. 27:</b> Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. causada por HCl. ....	107
<b>Fig. 28:</b> Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. causada por NaOH. ....	108
<b>Fig. 29:</b> Control de clorofilas y feofitinas <i>a</i> y <i>b</i> sin tratamiento con sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. ....	109
<b>Fig. 30:</b> Control y pigmentos fotosintéticos incubados con ácido úsnico. ....	110
<b>Fig. 31:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una célula de una hoja perteneciente a rama con densa población líquénica (sección ultrafina) ....	111
<b>Fig. 32:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una célula de una hoja perteneciente a rama libre de poblaciones líquénicas (sección ultrafina) ....	112

<b>Fig. 33:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Un cloroplasto de una hoja perteneciente a una rama libre de población líquénica .....	113
<b>Fig. 34:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Un cloroplasto de una hoja perteneciente a una rama con densa población líquénica.....	114
<b>Fig. 35:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Yemas pertenecientes a ramas con una densa población líquénica, tratadas por auxina exógena $10^{-4}$ M dispersada en vaselina. ....	120
<b>Fig. 36:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente a un árbol con densa población líquénica, tratada por auxina exógena $10^{-4}$ M. ....	121
<b>Fig. 37:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente al mismo árbol de la figura 36, sin tratamiento.....	122
<b>Fig. 38:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente a un árbol con densa población líquénica, tratada por auxina exógena $10^{-5}$ M. ....	123
<b>Fig. 39:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente al mismo árbol de la figura 38, sin tratamiento.....	124
<b>Fig. 40:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente a un árbol con densa población líquénica, tratada por auxina exógena $10^{-6}$ M. ....	125
<b>Fig. 41:</b> <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. Una rama, perteneciente al mismo árbol de la figura 40, sin tratamiento.....	126
<b>Fig. 42:</b> Análisis espectrofotométrico de las auxinas.....	127
<b>Fig. 43:</b> Auxina libre y conjugada en yemas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	128
<b>Fig. 44:</b> Auxina libre y conjugada en ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam.....	129
<b>Fig. 45:</b> Variación mensual de auxina libre en yemas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	130
<b>Fig. 46:</b> Variación mensual de auxina conjugada en yemas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	131
<b>Fig. 47:</b> Variación mensual de auxina libre en ramitas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	132
<b>Fig. 48:</b> Variación mensual de auxina conjugada en ramitas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	133

<b>Fig. 49:</b> Análisis por HPLC de la auxina patrón y la auxina extraída de yemas apicales de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	134
<b>Fig. 50:</b> Análisis por HPLC del ácido úsnico patrón y ácido úsnico extraído de yemas apicales de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> Lam. ....	135
<b>Fig. 51:</b> Análisis por HPLC de la mezcla de incubación conteniendo auxina patrón y ácido úsnico patrón.....	136
<b>Fig. 52:</b> Valoración por HPLC del conjugado resultante de la incubación de la auxina con el ácido úsnico .....	137
<b>Fig. 53:</b> Análisis por HPLC de la incubación de auxina con peroxidasa en ausencia como en presencia del ácido úsnico .....	140
<b>Fig. 54:</b> Inhibición de la degradación de auxina por peroxidasa en presencia del ácido úsnico .....	141
<b>Fig. 55:</b> Análisis por cromatografía bidimensional de las sustancias líquénicas de <i>Parmelia hypoleucina</i> (J.) Stein .....	142
<b>Fig. 56:</b> Separación por cromatografía líquida de alta resolución de sustancias líquénicas de <i>Parmelia hypoleucina</i> (J.) Stein .....	143
<b>Fig. 57:</b> Proporción de las sustancias líquénicas en el talo de <i>Parmelia hypoleucina</i> (J.) Stein .....	144
<b>Fig. 58:</b> Estructuras químicas de las sustancias líquénicas de <i>Parmelia hypoleucina</i> (J.) Stein .....	145
<b>Fig. 59:</b> Fórmulas estructurales del ácido úsnico y del ácido evérnico .....	150



<b>Tabla 1:</b> Naturaleza de la simbiosis líquénica.....	8
<b>Tabla 2:</b> Valores de $R_f$ de las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> .....	69
<b>Tabla 3:</b> Reactivos usados para la detección de las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> por TLC.....	70
<b>Tabla 4:</b> Tiempo de retención de cada una de las sustancias líquénicas de <i>Evernia prunastri</i> tras su separación por HPLC .....	69
<b>Tabla 5:</b> Compuestos químicos del extracto hidrofílico de hojas de <i>Quercus rotundifolia</i> .....	85
<b>Tabla 6:</b> Detección del ácido úsnico en yemas procedentes de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> .....	90
<b>Tabla 7:</b> Concentración del ácido úsnico después de incubarlo 5 días con ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> .....	90
<b>Tabla 8:</b> Tiempo de retención de los pigmentos fotosintéticos .....	100
<b>Tabla 9:</b> Medida de número de hojas y longitud de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> con cobertura líquénica de <i>Evernia prunastri</i> con y sin tratamiento por auxinas exógenas $10^{-4}$ M.....	118
<b>Tabla 10:</b> Medida de número de hojas y longitud de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> con cobertura líquénica de <i>Evernia prunastri</i> con y sin tratamiento por auxinas exógenas $10^{-5}$ M.....	119
<b>Tabla 11:</b> Medida de número de hojas y longitud de ramas de <i>Quercus rotundifolia</i> con cobertura líquénica de <i>Evernia prunastri</i> con y sin tratamiento por auxinas exógenas $10^{-6}$ M.....	119
<b>Tabla 12:</b> Valores de $R_f$ obtenidas por análisis por TLC de sustancias líquénicas de <i>Parmelia hypoleucina</i> .....	139
<b>Tabla 13:</b> Tiempo de retención de cada una de las sustancias líquénicas de <i>Parmelia hypoleucina</i> tras su separación por HPLC. ....	139



# *1. INTRODUCCIÓN*

## **1.1. LOS LÍQUENES**

### **1.1.1. Consideraciones generales**

Aunque los líquenes no forman una clase autónoma de criptógamas, sino que son definidos como hongos que viven en simbiosis con algas, se siguen estudiando como un grupo aparte, lo que está justificado por las particularidades de su morfología, de su anatomía y sobre todo de su biología. Todo es especial en este grupo y la naturaleza compleja de estos individuos genera problemas de alto interés.

Pero sólo desde la segunda mitad del pasado siglo se reconoce la verdadera naturaleza de líquenes. Antes de esta época, estaban confundidos con los otros talófitos, incluso con los briófitos, o estaban considerados como seres sencillos intermedios entre hongos y algas, formando una clase aparte de talófitos.

### **1.1.2. Repartición y número de especies.**

Más de 20.000 especies de líquenes crecen en el mundo entero. Es muy interesante comparar las relaciones entre el número de líquenes y el número de plantas superiores (como las coníferas y las plantas con flor) dependiendo de su localización geográfica. Esas relaciones son de 0,08 en regiones tropicales y ecuatoriales (líquenes bastante numerosos pero en número casi nulo en relación con la infinita variedad de la vegetación fanerogámica); 0,2 en región templada; 1 en región subártica (ejemplo de la Escandinavia); de 3 hasta 5 en región ártica. La relación extrema se alcanza en el continente antártico con 80 veces más líquenes que plantas superiores (AHMADJIAN, 1982 a y b)

### **1.1.3. Historia de los líquenes**

La gran importancia de los líquenes y el interés por saber sobre la diversidad que presenta este grupo, nos llevó a considerar su estudio con una cierta perspectiva,

primero desde la obra de DES ABBAYES (1951) en su "*Traité de lichenologie*", y después desde la de VAN HALUWYN y LEROND (1993) en "*Guide des lichens*", por los nuevos descubrimientos a propósito de estos seres que normalmente no son tan sencillos como parecen y porque de su complejidad deriva el gran papel que pueden jugar en casi todos los terrenos. Por eso hemos visto que es muy útil hacer un esquema de la historia de liquenología, haciendo referencia a la obra de DES ABBAYES, y complementarla con los nuevos descubrimientos, así que vamos a dividir tal historia en 5 etapas.

### 1ª etapa: Origen y significado antiguo del liquen

El término "*liquen*" es muy antiguo; fue aplicado por primera vez a las plantas, en el siglo IV antes J.C., por el griego THEOPHRASTO, discípulo de ARISTÓTELES. Sin embargo, los líquenes de THEOPHRASTO no eran realmente nuestros líquenes actuales sino hepáticas, salvo dos que podemos identificar actualmente como *Usnea* y *Rocella*. Los autores del renacimiento, en el siglo XVI, identificaron casi todos los líquenes como musgos y no diferenciaron *Muscus* y *Liquen*.

La distinción entre líquenes y musgos empezó con TOURNEFORT en 1694 y 1700; sin embargo, su distinción quedó imperfecta porque encontramos, descritos como líquenes, una *Marchantia* (hepática), un musgo y un helecho. En 1729 el italiano MICHELI describió muchos líquenes. Observó los apotecios y los consideró como receptáculos florales; siguió más el desarrollo de líquenes a partir de sus masas pulverulentas, o soredios, que se encuentran sobre el talo de muchas especies y asimiló su producción a los granos.

El alemán DILLENIIUS (1741) tuvo como base de clasificación en su obra "*Historia Muscorum*" la morfología de talos, al separar tres géneros de líquenes, *Usnea*, *Coralloides* y *Liquenoides*, bajo los cuales están descritos verdaderos líquenes. Se nota que hasta el momento las plantas estaban únicamente designadas bajo un nombre genérico. La nomenclatura binomial fue impuesta por el sueco LINNAEUS quien, en 1753, empezó a distribuir los líquenes en siete secciones según la forma del talo. Pero él así como sus sucesores inmediatos, no consideraron los líquenes como

plantas aparte y los clasificaron con las algas.

### 2ª etapa: Distinción entre líquenes y otros criptógamas:

ACHARIUS, desde 1798 hasta 1814, consiguió no sólo distinguir los líquenes de otras criptógamas sino que hizo de la liquenología una rama especial dentro la Criptogamia. También reconoció los apotecios y los soledios como órganos de reproducción de los líquenes. Por eso merece llamarse el padre de la liquenología. Su clasificación se basó no solamente en la morfología del talo sino también en la de los apotecios, una clasificación de líquenes con numerosos géneros y especies cuyos nombres persistieron hasta nuestros días. Es el inventor de toda una serie de términos que sirven en la descripción de líquenes: *thallus*, *podetium*, *apothecium*, *soredium*, etc.

A partir de ACHARIUS, la atención de los naturalistas se centró más sobre los líquenes y los trabajos sobre ellos fueron cada vez más numerosos. Pero la lupa era todavía el único medio de investigación.

El alemán WALLROTH (1829) fue quien inventó la palabra “*gonidios*”, llamando así los elementos verdes del talo y distinguiéndolos de los elementos incoloros o hifas. Pero se equivocó sobre el significado de gonidios, ya que los asimiló a células reproductivas, aunque el nombre que les dio, a pesar del error del que surge, se sigue usando en la actualidad.

### 3ª etapa: El uso de microscopio en liquenología:

El uso de microscopio deja atrás el estudio de líquenes por la simple lupa y permitirá precisar y conocer la verdadera naturaleza de los líquenes.

En 1846, el italiano DE NOTARIS mostró la importancia de las esporas para la clasificación de líquenes y el establecimiento de géneros. Este autor fue seguido inmediatamente, en este camino, por el italiano MASSALONGO (1852), el alemán KOERBER (1855) y el finlandés NYLANDER (1854).

NYLANDER (1866,1867), afincado en Francia hasta su muerte (1899) consagró su existencia entera al estudio de los líquenes. Su nombre domina toda la liquenología sistemática de la segunda mitad del siglo XIX por la importancia y el considerable número de especies nuevas (casi 3.000 especies) que recibió de todas las partes del mundo y las describió. Fue él quien descubrió las reacciones químicas de los compuestos característicos de los líquenes y quien las aplicó al reconocimiento de especies.

En 1852, el francés TULASNE publicó una importante memoria sobre la anatomía de líquenes y sobre sus órganos reproductores.

En 1866, el alemán DE BARY emitió tímidamente la hipótesis de que determinados líquenes eran solamente unas algas penetradas por filamentos de hongos.

En 1817, CASSINI consideró los *Nostoc* (cianobacterias) como unas *Collema* (líquenes) estériles. En 1867, FAMINTZIN y BARANETZKY y un año más tarde ITZIGSOHN llegaron a probar un cultivo en agua de unos gonidios de líquenes.

#### 4ª etapa: Descubrimiento de la verdadera naturaleza del liquen

SCHWENDENER, nombre clave en la liquenología, en dos célebres memorias (1867 y, sobre todo, 1869), desarrolló la hipótesis de DE BARY y se apoyó sobre hechos precisos. Reconoció, incluso, en los gonidios de líquenes, unos tipos que se relacionan con diversas algas libres. Enunció su teoría como: “ *los líquenes son unos seres dobles, formados por la unión de una alga y de un hongo*”. Al principio, esta teoría encontró una resistencia enorme por parte de los liquenólogos, tales como KOERBER (1855) y KREMPELHUBER (1872), pero el más fuerte de sus detractores fue NYLANDER (1870).

Otros, al contrario, fueron atraídos enseguida por la nueva doctrina y aportaron con sus propios trabajos una importante contribución a los argumentos de SCHWENDENER. Tal fue el francés BORNET (1873). Pero fue el francés GASTON BONNIER quien, en 1886 y 1889, aportó la más alta confirmación a la teoría algo-

líquénica, realizando, a partir de una espora y de una alga, la síntesis de un líquen.

FINK (1911) dio un paso adelante en la descripción de la naturaleza doble de los líquenes considerando que *“un líquen es un hongo que vive toda o una parte de su vida parasitando una alga huésped y manteniendo una relación con su sustrato orgánico o inorgánico”*.

Desde entonces, la naturaleza doble de líquenes es demostrada, y en nuestros días, admitida por todos. Un compatriota de NYLANDER, ELFVING (1913) se encargó de demostrar que la hifa sale de los gonidios.

A finales del pasado siglo y a principios de éste, los trabajos de liquenología son cada vez más numerosos. STAHL (1877), F.M. BACHMANN (1912 y 1913) y más tarde F. y Mme MOREAU (1928) atacan los problemas de la sexualidad de líquenes y del origen del apotecio.

HUE (1900) estudió la anatomía de numerosos líquenes y propuso una clasificación que HARMAND aplicó a una importante obra de sistemática (1905-1913).

En 1907 y más tarde, entre 1922-1940, ZAHLLBRUCKNER reformó la clasificación de los líquenes teniendo en cuenta todos los factores, particularmente de la afinidad del hongo. Es esta clasificación la que es actualmente adoptada por todos.

La biología y la química de los líquenes tomaron una importancia considerable. CHODAT(1913), JAAG (1929), RATHS (1938) y QUISPEL (1945) hicieron cultivos puros de gonidios de líquenes según las técnicas modernas, mientras que MÖLLER (1887), TOBLER (1909), WERNER (1927) e igualmente THOMAS (1939) y QUISPEL (1945) cultivaron de forma aislada sus hongos a partir de la espora para realizar la síntesis de líquenes.



HESSE (1904), ZOPF (1907) y más tarde los japoneses ASAHINA y SHIBATA (1954) aislaron los productos químicos elaborados por los líquenes y explicaron las reacciones de coloración que descubrió NYLANDER.

### 5ª etapa: Naturaleza mutualista o parasitaria de la simbiosis líquénica.

El término *simbiosis*, de origen griego, significa vida en conjunto y fue creado en 1879 por el botánico alemán DE BARY para caracterizar la asociación entre el alga y el hongo en el organismo compuesto. En sentido amplio, la simbiosis abarca organismos viviendo en conjunto en asociación mutualista, comensalista o antagonista. La simbiosis mutualista implica la noción de aprovechamiento más o menos estructurado por los dos compañeros, con el establecimiento de relaciones recíprocas. El comensalismo corresponde a unas relaciones de buenos vecinos, bastante débiles, a veces más favorable a uno de los asociados. La noción de agresividad aparece en la simbiosis antagonista: es el parasitismo.

La simbiosis líquénica es un perpetuo ballet de inducciones o de inhibiciones (recíprocas o unidireccionales) entre los asociados. Esta complejidad es ciertamente el origen de seis interpretaciones sobre la naturaleza de la simbiosis, formuladas desde 1869 hasta 1945. La Tabla 1 presume los conocimientos antiguos y actualizados, además de los argumentos más avanzados. Hoy día, los investigadores contemporáneos mantienen la teoría de, o una simbiosis mutualista (HAWKSWORTH), o una simbiosis antagonista (AHMADJIAN). Las reflexiones de BOULLARD (citado por HALUWYN y LEROND en *Guide des lichens* (1993)) nos pueden ayudar a entender mejor esta dualidad de interpretación. Según la importancia asignada a uno o al otro de dos asociados, el biólogo será incitado a notar cualquiera cosa de armonía (mutualismo) o, al contrario, de conflicto (antagonismo). La existencia de lectinas de reconocimiento, producidas por el hongo para seleccionar un alga compatible (BUBRICK *et al.*, 1981) puede transformarse en un ataque parasitario si el alga no ha diferenciado un ligando de pared (MOLINA, 1995). Los trabajos de MOLINA y VICENTE (1995 y 1996) y MOLINA *et al.* (1996 y 1997) ayudan a entender más este tipo de relación entre los dos asociados del liquen y apoyan la teoría del origen parasitario de la simbiosis en un sentido amplio.



NATURALEZA DE LA SIMBIOSIS LIQUENICA	1951 (Traité de lichenologie de Des Abbayes).	Tipo de simbiosis					
		Simbiosis mutualista		Simbiosis antagonista			
		Integral <i>De Bary</i> 1879	Mitigada <i>Quispel</i> 1945	Helotismo <i>Swendener</i> 1869	Parasitismo <i>Bornet</i> 1873	Endosaprofitismo <i>Elenkin</i> 1902	Algoparasitismo <i>Moreau</i> 1927
		Ayuda mutua de los simbios	-Ayuda mutua de los simbios -El hongo saprofita el alga muerta y parasita algunas algas vivas	El hongo envuelve el alga	El hongo parasita el alga	El hongo saprofita las algas muertas.	el alga parasita el hongo.
Actualmente		 <p>Es la teoría desarrollada por <i>Hawksworth</i> (1988).</p> <p>Argumentación mayor:</p> <p>El liquen soporta unas condiciones de vida que ninguno de los dos asociados podría soportar en estado libre.</p>		 <p>Es la teoría desarrollada por <i>Ahmadjian</i> (1982c y 1993)</p> <p>Argumentación mayor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La existencia de Haustorio.</li> <li>- Cuerpos concéntricos.</li> <li>- Transformación que sufre el hongo liquenizado.</li> </ul> <p>Argumentación a favor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arginasa fúngica con actividad hidrolítica lo que implica el aumento de la concentración de poliaminas. (<i>Molina et al.</i> (1996) y <i>Molina y Vicente</i> (1995)).</li> <li>- Rotura de pared celular del alga. (<i>Molina y Vicente</i> (1996) y <i>Molina et al.</i> (en prensa))</li> <li>- Regulación del tamaño poblacional del alga. (<i>Molina et al.</i> (1997)).</li> <li>- Desarrollo de Haustorio. (<i>Molina y Vicente</i> (1996)).</li> </ul>			

**Tabla 1:** *Naturaleza de la simbiosis líquénica modificado de Haluwyn y Lerond (1993)*

#### 1.1.4. Definición de un líquen

Desde BERKELEY (1869), citado por HALUWYN y LEROND en *Guide des lichens* (1993), hasta HAWKSWORTH (1988) la definición del líquen conoció un inmenso progreso y pasó de constatar que “*era imposible diferenciar los líquenes de los hongos*” a que “*un líquen es una asociación estable, independiente, entre un micosimbionte y un fotosimbionte, en la cual el micosimbionte es el asociado que rodea al otro*”. BELLEMÈRE (1973) propone de añadir “*en una estructura original, el talo líquénico*”, porque tiene unas características diferentes a la vez del talo de algas y del micelio de hongos. Esta definición insiste sobre la disposición estructural de los asociados, noción que no estaba integrada en la definición precedente de HAWKSWORTH *et al.* (1983): *un líquen es una asociación independiente entre un hongo (micobionte) y un alga o una cianobacteria (fotobionte)*.

AHMADJIAN (1993) considera que la definición dada por HAWSWORTH es a la vez desordenada y confusa en 2 puntos. Primero, porque no reconoce el carácter único distintivo de los líquenes, cual es la notable transformación que sufre el hongo cuando se une al alga. Según JAHNS (1988), es el talo líquénico la estructura que diferencia entre hongo liquenizado y no liquenizado. Segundo, porque la mayoría de los hongos penetran en las células del fotobionte. Técnicamente, por esta razón, según la definición de HAWSWORTH, el micobionte puede ser considerado tanto asociado interno como asociado externo. Para concluir, y después de estas críticas dirigidas a HAWKSWORTH, AHMADJIAN da una nueva definición del líquen:

*“Un líquen es una asociación entre un hongo, generalmente un ascomiceto, pero en pocos casos un basidiomiceto o deuteromiceto, y uno o más asociados fotosintéticos, generalmente algas verdes o cianobacterias. En todos los líquenes, el hongo forma el talo o el estroma liquenizado que puede tener compuestos secundarios únicos”.*

#### 1.1.5. Líquenes epífitos.

##### 1.1.5.1. Ecología y ecofisiología de la implantación del epífito

Epífitos son plantas no parásitas que viven y crecen sobre otras, generalmente

plantas leñosas. La clasificación de los líquenes epífitos se basa según su implantación en hojas, en la corteza o en la madera de las plantas leñosas. Entonces son folícolas, corticícolas o lignícolas. Según el desarrollo del talo en el interior o en el exterior de la corteza, las corticícolas se dividen en endoflóedicos y epiflóedicos. Estos últimos incluyen una serie de especies que muestran una estrecha dependencia de sustratos arbóreos, en muchas ocasiones de árboles específicos. De hecho, una de las características de referencia más claras para definir un líquen es su sustrato.

Se ha<sup>2</sup> descrito que la textura de la corteza del huésped puede ser un factor determinante de la colonización: es más fácil que las esporas fúngicas queden atrapadas e inicien su desarrollo sobre superficies rugosas (KALGUTKAR y BIRD, 1969; ADAMS y RISSER, 1971). También se ha comprobado que son diferentes las comunidades liquénicas que colonizan las zonas lisas o las rugosas de un mismo árbol (DEGELIUS, 1964; BRODO, 1968).

JOHNSON (1940) sugirió que la distribución de ciertos líquenes crustosos epiflóedicos viene determinada por la disponibilidad de humedad a partir de la corteza viva de los árboles y que la absorción y acumulación de agua por estas cortezas depende de una serie de factores químicos y estructurales. DES ABBAYES (1932) determinó, en este sentido, que esta capacidad es mayor en robles que en pinos y que la liberación de agua, desde la corteza, a potenciales epífitos cumple la misma relación. También se han establecido relaciones y diferencias entre *Quercus vetulina* y *Quercus alba* (HALE, 1955) o entre *Pinus albicaulis* y *Larix lyalli* (KALGUTKAR y BIRD, 1969). Incluso para el mismo árbol, MARGOT (1965) pudo determinar diferencias de humedad en un gradiente descendente con la edad de los álamos y un *continuum* de líquenes epífitos de acuerdo con este gradiente.

El tipo de líquenes que colonizan cortezas de árboles también está en relación con la disponibilidad de electrolitos, que puede reflejarse en el contenido en cenizas de dichas cortezas.

También se ha aducido en un buen número de casos que el pH de la corteza actúa como factor de selección de la especie particular de epífito. Se pueden encontrar

diferencias notables de pH entre grandes grupos de árboles. Mientras que la mayor parte de los de hoja caduca tiene un pH en corteza entre 4,5 y 7, las coníferas lo tienen más bajo, entre 3 y 5 (HALE, 1983). Un efecto primario del pH puede ejercerse sobre la germinación de esporas fúngicas y sobre el crecimiento de algas de vida libre, potenciales formadores de asociación simbiótica. El pH óptimo para el crecimiento de las algas suele ser cercano a la neutralidad, por tanto, diferente al de la corteza y al óptimo de germinación de las esporas (GROSS y AHMADJIAN, 1966).

### **1.1.5.2. Sustancias liquénicas**

#### **1.1.5.2.1. Denominación y naturaleza de sustancias liquénicas**

PFAFF (1826) aplicó el nombre de “ácidos de líquenes” a todas las sustancias químicamente definidas, elaboradas en el talo y siempre, al menos al final, excretadas al exterior de hifas. Los autores de lengua alemana designaron estos ácidos liquénicos bajo el nombre de “*Flechtenstoffe*” que significa “sustancias químicas de líquenes”, nombre más general y más correcto que el de ácidos porque si algunos son verdaderos ácidos otros son neutros (DES ABBAYES, 1951). CULBERSON (1969) aplicó un nuevo término llamando a dichas sustancias, sustancias o productos liquénicos; sin embargo este término tenía el mismo sentido que los anteriores, porque abarca toda clase de sustancias orgánicas encontradas en dichas plantas. VICENTE (1975), considerando que este nuevo término es ambicioso y también equívoco, se limita, llamando sustancias liquénicas sólo a los grupos de compuestos que sean absolutamente específicos de líquenes, que únicamente estas plantas los contengan y que sólo ellas puedan sintetizarlos. Estas sustancias, que son exclusivas de la simbiosis liquénica, incluyen cuatro tipos de estructuras: dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos, y ácidos úsnicos, todos ellos compuestos polifenólicos de origen común a partir de ácidos carboxílicos policetónicos derivados del ácido acético.

### 1.1.5.2.2. Localización y concentración

Las sustancias líquénicas se diferencian del resto de los componentes fenólicos vegetales por su particularidad de considerarlos como productos extracelulares (HALE, 1967, 1974; HAWSWORTH, 1976), ya que, siendo sintetizadas por las hifas del micobionte, son excretadas y depositadas como cristales sobre su superficie antes que ser retenidas dentro de las células. Sin embargo, otros compuestos fenólicos vegetales tienen siempre localizaciones intracelulares, bien disueltos en el citoplasma o internalizados en vacuolas, como los flavonoides, bajo forma de pequeñas vesículas citoplásmicas que encierran y aíslan en su interior los taninos, bien como vesículas o láminas localizadas en el citoplasma periférico o unidas a la pared celular, como las ligninas.

La irregularidad de los líquenes dentro del reino vegetal no sólo viene de la producción de las sustancias líquénicas, sino también por la alta concentración de ellas que puede almacenar el talo. Esas sustancias pueden jugar un papel muy importante en la resistencia de los líquenes contra las invasiones bacterianas debido a su carácter antibiótico. Como ejemplo de esa alta concentración, el ácido norstictico que puede representar hasta el 6 por 100 del peso seco del talo líquénico. Otro de los papeles más importantes que tienen las sustancias líquénicas en particular, y los productos secundarios en general, especialmente compuestos aromáticos, es su aplicación taxonómica (HAWSWORTH, 1976). Por ejemplo el ácido rododadónico es característico de la familia *Cocciferae* y la aparición de parietina es característica de la familia *Teloschistaceae*. Por último, hay una serie de derivados fenólicos que sólo han sido encontrados, por lo menos hasta hoy, en líquenes y cuyo origen es común a partir de ácidos carboxílicos policetónicos, derivados del ácido acético. Estos ácidos, de cadena abierta, se ciclan de dos formas distintas para dar dos unidades fenólicas básicas. El primer tipo de ciclación sigue el modelo del ácido orselínico, primer ácido fenólico que es la base estructural de dépsidos, depsidonas y dibenzofuranos. El segundo tipo de ciclación sigue el modelo de floroglucinol, constituyendo la base estructural de los ácidos úsnicos.

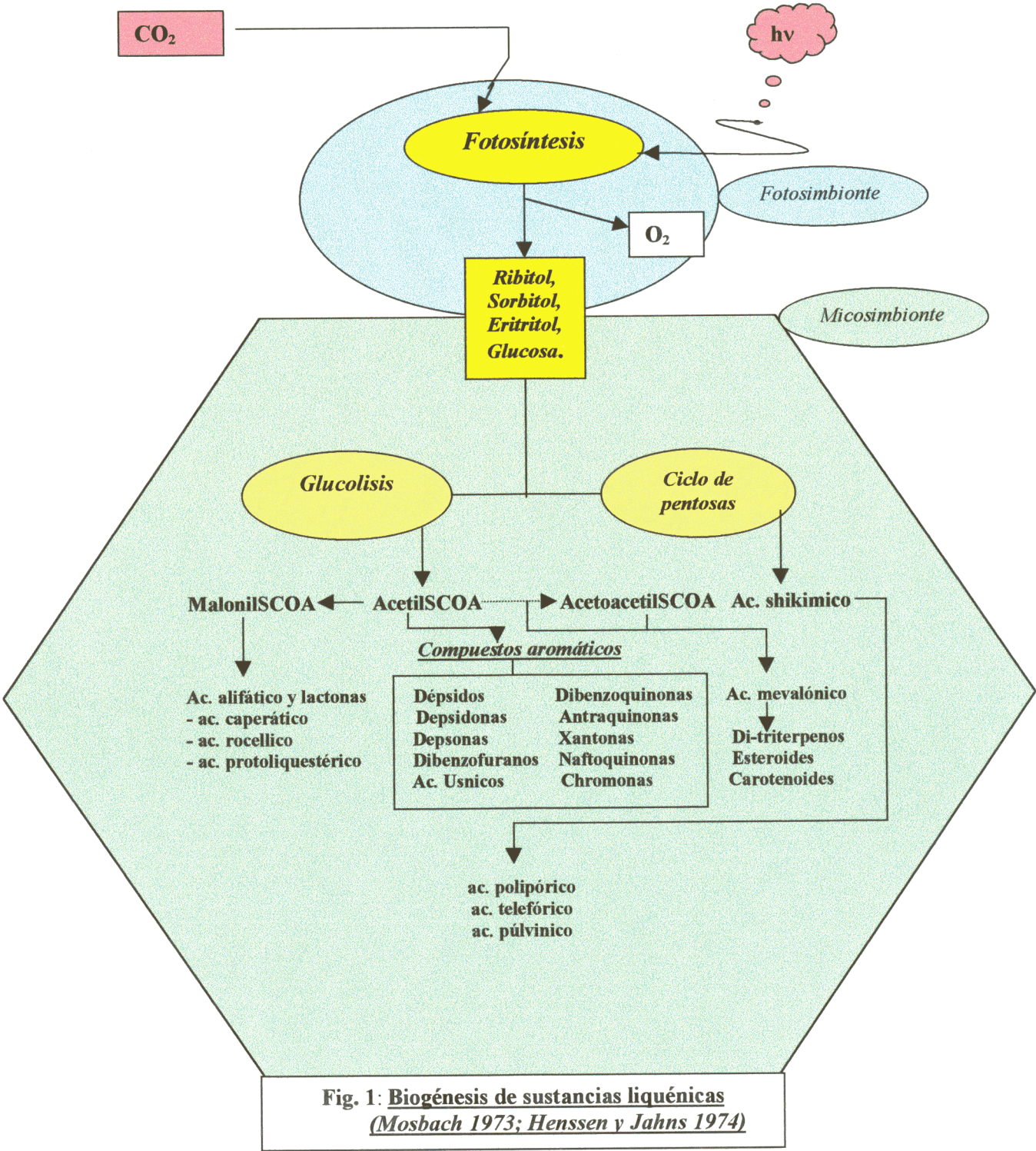
### 1.1.5.2.3. Biogénesis de las sustancias liquénicas (véase Fig. 1)

### 1.1.5.2.4. Importancia de las sustancias liquénicas

El liquen, siendo una unión compacta y sólida entre dos asociados, aprovecha de las siguientes características de sus específicas sustancias liquénicas:

- *Hidrofobia*: las sustancias liquénicas contribuyen al mantenimiento del equilibrio hídrico del talo limitando la evaporación del agua en la superficie del mismo y controlando las vías de transferencia al interior del talo (ARCHER, 1981).
- *Propiedades quelantes*: los líquenes pueden asegurar una determinada protección por quelación de metales pesados, sobre todo los presentes en el medio (SYERS e ISKANDAR, 1973).
- *Absorción de radiaciones luminosas*: La variación de la intensidad y coloración de talos de *Xanthoria parietina* en función de los rayos solares es el resultado de una variación de concentración en parietina (SCOTT, 1971). Así se asegura la protección del alga asociada en líquenes contra las radiaciones luminosas (MATEOS *et al.*, 1993).
- *Conversión de radiaciones luminosas*: con la presencia de atranorina en la corteza superior, las longitudes de onda no usados por el fotosimbionte se convierten a longitudes útiles (HENSSEN y JAHNS, 1974).
- *Regularización de la actividad fotosintética del alga*: las sustancias liquénicas regulan la actividad fotosintética del alga según diversos mecanismos todavía mal elucidados. Permiten al micosimbionte de mantener la población algal en una capa de espesor uniforme a lo largo de la vida del talo (HONEGGER, 1987).
- *Propiedades antibióticas*: las sustancias liquénicas inhiben la germinación de semillas (NISHITOBA *et al.*, 1987), pero no es una norma absoluta. En ciertos casos pueden estimular la germinación (DAURIAC y RONDON, 1976). Esta acción inhibito-





ria se observa sobre las esporas de briofitos (BUSTAMANTE *et al.*, 1989) y hongos (TOLPYSHEVA, 1984 a,b), también sobre otros líquenes. Además, muchos fenoles líquénicos son activos antibióticos frente a bacterias Gram+ (BUSTINZA y CABALLERO, 1947; PEREIRA *et al.*, 1994).

Las propiedades medicinales, nutricionales y odoríferas de las sustancias líquénicas en particular y de los líquenes en general fueron descritas por RICHARDSON (1988). Los liquenólogos las usan como una base para la taxonomía.

### 1.1.5.3. Relación del liquen con el fitóforo

#### 1.1.5.3.1. Del epifitismo al parasitismo.

La antigua idea de que los líquenes epífitos no causan daño a los huéspedes está siendo actualmente criticada a la luz de los descubrimientos realizados en los últimos años. Incluso SMITH (1921) afirma textualmente: *“Prácticamente todos los líquenes cortícolas son epífitos y el daño que causan es de naturaleza accidental. Las especies crustosas sobre la madera externa ocupan las capas corticales muertas y parecen ser enteramente inofensivas. Las formas foliosas y fruticulosas no son tan inocuas: a causa de un abundante crecimiento envolvente estorban la entrada de aire y humedad y, por tanto, impiden la vida vegetal que los soporta”*. Muchos de estos epífitos realizan un auténtico ataque parasitario sobre sus fitóforos, gracias a la inyección de fenoles en el xilema. Estos fenoles serían transportados acrópetamente hasta las hojas provocando desfoliación, en mayor o menor extensión, según la densidad de cobertura sobre tronco y rama.

ASAHINA y KUROKAWA (1952) fueron los primeros en describir tal inhibición del desarrollo de ejes caulares de té por líquenes epífitos. BROWN y MIKOLA (1974) observaron un descenso en la velocidad de crecimiento de *Pinus sylvestris*, causado, probablemente, por la acción inhibidora de los líquenes terrícolas sobre la asociación de los raíces del pino con micorrizas.



HALE (1983), después de un considerable número de observaciones en el campo, llegó a pensar que el crecimiento de epífitos sobre el fitóforo provoca una sensible pérdida de vitalidad. En el mismo sentido, VICENTE (1988) observó que una densa población de líquenes implantados sobre ramas de *Quercus rotundifolia* conduce a la falta de hojas, sin que ello pueda ser atribuido a la edad de la rama y que este efecto es particularmente dramático en arbustos jóvenes, en los que la invasión por líquenes coincide con una atrofia del individuo. También en las ramas con abundante cobertura líquénica se observa una reducción de volumen respecto a las ramas libres de epífitos, quedando aquellas reducidas a la mitad o a la tercera parte del espacio ocupado por estas últimas.

AVALOS *et al.* (1986) demostraron la presencia de los ácidos evérnico y evernínico en ramas de encina poblados por *Evernia prunastri* y *Ramalina calicaris*, que pueden translocarse vía xilema hasta alcanzar las hojas. FOLLMANN y PETERS (1966), PYATT (1967), RAMAUT y THONAR (1972 a,b), DAURIAC y RONDON (1976), demostraron bajo condiciones del laboratorio, la toxicidad de las sustancias líquénicas.

OZENDA y CLAUZADE (1970) especifican que las interacciones entre los líquenes epífitos y sus fitóforos se pueden acompañar con la difusión de sustancias líquénicas ejerciendo una acción fitocida para el huésped, con referencia a los ácidos sequicaico y úsnico, producidos por el liquen tropical *Ramalina tayloriana*.

#### 1.1.5.3.2. Penetración del epífito en el sustrato

La penetración de los líquenes epífitos en su fitóforo fue un tema abordado desde finales del siglo XIX y fuertemente controvertido, sin que, hasta muy pocos años, se aportaran pruebas definitivas a este respecto. La cuestión estaba planteada entre dos extremos: o bien se trata de una penetración activa que alcanzaba tejidos vivos, o bien sólo una penetración superficial, a través de heridas y lenticelas sin alcanzar el tejido vivo profundo.

FRANK (1877) y BONNIER (1889) fueron los primeros en describir cómo las hifas de *Trentepohlia* llegaban hasta la peridermis de su huésped, provocando ruptura de las membranas y de las paredes celulares. LINDAU (1904) demostró que los líquenes epífitos penetraban hasta la peridermis del fitóforo, creciendo entre sus células por simple presión mecánica sin perforar las paredes celulares. PORTER (1917) describía cómo hifas de *Ramalina* penetraban en su huésped a través de la corteza, cortex, floema y cambium. BRODO (1973) considera que los líquenes epífitos pueden penetrar en distintos grados en los tejidos del fitóforo.

ESTÉVEZ *et al.* (1980) demostraron, por la aplicación de técnicas de coloración para hongos parásitos realizados en cortes de ramas de *Fagus sylvatica*, usando la zona de inserción de *Evernia prunastri*, la existencia de una penetración periférica que, comenzando a través de heridas superficiales y lenticelas, invadía la peridermis y llegaba incluso hasta los vasos conductores del xilema. El mismo año, ASCASO *et al.* (1980) realizaron cortes extrafinos secuenciados desde el punto de inserción del mismo liquen en ramas de *Quercus pyrenaica* en sección transversal, cuya observación al microscopio óptico demostró que las hifas líquénicas atravesaban las capas suberificadas de la corteza, destruyendo las células del huésped. Usando tanto el microscopio electrónico de transmisión (MET) como el microscopio electrónico de barrido (MEB), ORUS y ASCASO (1982) describieron similares resultados para *Evernia prunastri* epífito sobre *Quercus rotundifolia*, donde las hifas fueron halladas en el interior de los elementos floemáticos, con claras indicaciones de penetración activa a través de sus paredes celulares.

BELLEMÈRE (1973) demostró que muchos ascomicetos parásitos contienen los cuerpos concéntricos cuya naturaleza, aún hoy, es desconocida. Esos mismos cuerpos concéntricos fueron encontrados justamente en las hifas en el punto de inserción del liquen sobre la corteza del árbol (ASCASO *et al.*, 1980).

MOISSEJEVA (1961) señaló la abundante producción de enzimas extracelulares por parte del liquen en las zonas del talo en contacto más estrecho con sustrato, lo que sugiere la existencia de, no solamente una penetración física, sino también una penetración química de las hifas del liquen en los tejidos, siguiendo una pauta

enzimática semejante a la desarrollada por hongos parásitos y produciendo enzimas celulasa y poligalacturonasa, capaces de degradar las paredes celulares primarias y secundarias del fitóforo.

Se han detectado en líquenes las actividades  $\beta$ -1,4-glucanasa (ESTÉVEZ y ORUS, 1981), y poligalacturonasa (YAGÜE *et al.*, 1984), ambas inducibles y parcialmente segregables al medio de incubación. VICENTE (1988) sospechó que una  $\beta$ -1,4-glucanasa preexistente, parcialmente inactiva, pudiera ser activada mediante un factor proteico, o dependiente de una proteína, cuya síntesis sería impedida por cicloheximida, en lugar de existir una auténtica inducción de la glucanasa. Esta sospecha venía apoyada por el hecho de que una endogluconasa de *Evernia prunastri* era rápidamente activada tras hidratación del talo mientras que su deshidratación causa una drástica pérdida de la actividad enzimática (YAGÜE, 1987).

#### 1.1.5.3.3. Interacciones nutricionales entre líquenes epífitos y su fitóforo

Cuando se habla de relación de los epífitos con su fitóforo, la interacción nutricional sería el buen ejemplo para definir y aclarar tal relación. Se ha comprobado que la mayoría de los azúcares y carbohidratos que tiene el liquen son semejantes a los que existen en la corteza del árbol (SRIVASTAVA, 1945 y 1964). SMITH (1962) demostró, en cultivos *in vitro*, que los líquenes son capaces de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos de carbono y nitrógeno, sin olvidar que el ficobionte del liquen, siendo un cloroficea, es incapaz de fijar el nitrógeno atmosférico. SOLBERG y SELMER-OLSEN (1978) encontraron altos contenidos de mercurio en especies de *Alectoria*. Un año más tarde, SOLBERG (1979) trabajando sobre talos de *Alectoria fremontii* y troncos de su sustrato *Pinus sylvestris*, demostró que la acumulación de iones por el liquen epífito estaría más relacionada con el aporte de lixiviados por el agua de lluvia, que escurre por el tronco que con la composición iónica de la propia corteza. PIKE (1978) logró resultados concordantes para diferentes especies liquénicas que crecían en bosques *Pseudotsuga menziesii*, *Abies balsamea* y *Acer saccharum*.

En general, los líquenes situados en la porción más baja del dosel arbóreo pierden minerales por lixiviación más rápidamente que los líquenes que crecen en la

parte superior de aquel. Sin embargo, el agua de lluvia, lixiviando minerales de las hojas de los árboles, puede subvenir a ciertas necesidades nutricionales de los epífitos. La relación nutricional con el agua de lluvia fue también encontrada por BOSSERMAN y HAGNER (1981). Sin embargo, trabajando con especies de *Usnea* y *Parmelia* que crecían sobre cipreses y sobre arbustos demostraron que los epífitos contenían mayoritariamente los elementos principales del sustrato.

#### 1.1.5.4. Liqueen epífito: *Evernia prunastri* (L.) Ach.

##### 1.1.5.4.1. Características diferenciales

*Evernia prunastri*, llamado vulgarmente “musgo de encina”, tiene un talo ramificado, aplastado en tiras y una estructura parecida al tipo estratificado, pero carece de rizinas y fijado al sustrato por un punto terminal. La composición mineral de *Evernia prunastri* incluye principalmente sílice, sodio, magnesio, cloro, y potasio. También tiene, pero en cantidades bajas, sulfato y fosfato. Esta composición puede variar en proporción según el tipo de sustrato.

Las sustancias de reserva, como hemicelulosa para las plantas superiores, son polímeros formados por diversas mezclas de galactosano, manosano y dextrosano, que suelen estar localizadas sobre todo en paredes de las hifas medulares (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

La posición de la especie *Evernia prunastri* (L.) Ach. fue realizada por OZENDA y CLAUZADE (1970) de la siguiente manera:

**Clase:** Ascolíquenes  
**Subclase:** Discolíquenes  
**Orden:** Cyclocarpales  
**Suborden:** Lecanorinae  
**Familia:** Usneaceae  
**Género:** *Evernia* Ach.  
**Especie:** *Evernia prunastri* (L.) Ach.

*Evernia prunastri* es un líquen epífito principalmente corticícola de árboles y arbustos, excepcionalmente lignícola, saxícola o terrícola. Es una especie que se une al sustrato mediante prolongaciones de las hifas de córtex (SCOTT, 1971; SEAWARD, 1977). Especie más o menos fotófila, acidófila, prefiere cortezas que van desde neutras a muy ácidas: pH de 5,6 a 3,4; anitrófilas o moderadamente nitrófilas. De clima templado y ombroclima predominantemente húmedo y con algunos enclaves subhúmedos, no existiendo en los áridos.

#### 1.1.5.4.2. Sustancias liquénicas características

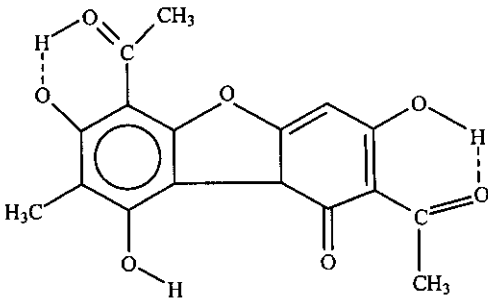
Las sustancias liquénicas aisladas de *Evernia prunastri* han sido citadas por CULBERSON (1969 y 1970) y CULBERSON *et al.* (1976). Tales sustancias son atranorina, cloroatranorina, ácido úsnico y ácido evérnico (Fig. 2). Estos ácidos carboxílicos policetónicos derivados del ácido acético, de cadena abierta, se ciclan de dos formas distintas para dar dos unidades fenólicas básicas. El primer tipo de ciclación sigue el modelo del ácido orselínico, primer ácido fenólico que es la base estructural de dépsidos, depsidonas y dibenzofuranos (ácido evérnico, atranorina y cloroatranorina). El segundo tipo de ciclación sigue el modelo de floroglucinol, constituyendo la base estructural de los ácidos úsnicos.

Se habla de compuestos de la serie del orcinol cuando el ácido orselínico es la base fenólica estructural para la formación de dépsidos y depsidonas, y de la serie de  $\beta$ -orcinol si, además del producto de ciclación orselínica, presenta un sustituyente de un solo átomo de carbono en la posición 3 del anillo A (3' del anillo B), siendo este compuesto la base estructural de dépsidos y depsidonas.

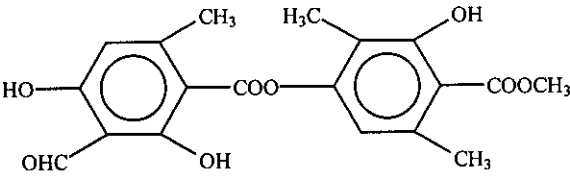
El ácido evérnico es *p*-dépsido de la serie del orcinol, mientras que la atranorina y la cloroatranorina son *p*-depsidos de la serie  $\beta$ -orcinol.

#### 1.1.5.4.3. Relación con el fitóforo

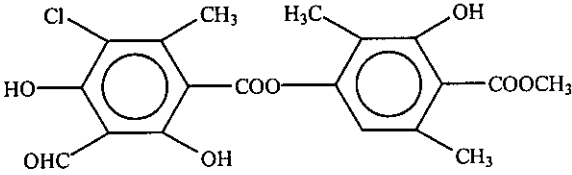
Según estudios realizados por LINDAU (1895), fue demostrado que el talo de



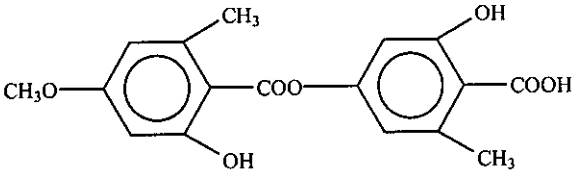
Acido úsnico



Atranorina



Cloroatranorina



Acido evérnico

**Fig. 2.** Sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach.

*Evernia prunastri* está unido al sustrato por aprehensorios que envolvían un substancial grado de penetración. No obstante, LINDAU especificó que no fueron observadas hifas fuera de los límites de las células peridérmicas muertas. Muchos autores apoyaron este punto de vista. Solamente uno, PORTER (1917), trabajando con *Ramalina*, género filogenéticamente cercano a *Evernia*, describió una extensa penetración de las hifas de esta especie en la madera de su sustrato hasta alcanzar el cambium. Las principales vías de penetración para las hifas son tanto las heridas como las lenticelas y siendo los espacios intercelulares las únicas vías para su desarrollo posterior. Los estudios de ESTEVEZ *et al.* (1980), aplicando los métodos de tinción de hongos parásitos en ramas desgajadas de *Fagus sylvatica*, describieron, en los puntos de inserción del liquen con la rama, un cierto grado de penetración en la madera a través tanto de heridas como de lenticelas. En otros casos, la penetración de las hifas se lleva a cabo atravesando tejidos intactos y invadiendo los espacios próximos.

El mismo año, ASCASO *et al.* (1980) estudiaron, mediante cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico, el efecto de *Evernia prunastri* creciendo sobre ramas de *Quercus pyrenaica*, estudios que reafirmaron los resultados anteriores en la peridermis. A nivel vascular se encontraron hifas tanto en los espacios intercelulares como en el interior de las células, principalmente dentro de los elementos xilemáticos. Por otra parte ORUS y ASCASO (1982) y ASCASO (1985) encontraron hifas de *Evernia prunastri* en el interior de los vasos conductores de *Quercus rotundifolia*, usando tanto el microscopio óptico, como el microscopio electrónico de transmisión y de barrido, con la aparición frecuente de cuerpos concéntricos típicos del estado de simbiosis en el punto de inserción del liquen sobre la corteza del árbol, y con claras indicaciones de penetración activa a través de sus paredes celulares y relacionaron dicha cobertura liquénica con fenómenos de desfoliación del fitóforo. Además de la penetración física de las hifas liquénicas, ESTEVEZ y ORUS (1981), comprobaron que *Evernia prunastri* presenta actividad  $\beta$ -1,4-glucanasa inducible y segregable, capaz de degradar la celulosa. Posteriormente YAGÜE (1987) indicó la posible localización de una  $\beta$ -1,4-glucanasa de *Evernia prunastri* preexistente activada por hidratación del talo. ESTEVEZ *et al.* (1982) observaron, en condiciones naturales y simuladas, la aparición de una intensa desfoliación de sus ramas densamente cubiertas del liquen, atribuyéndola a la inclusión de las sustancias liquénicas de *Evernia prunastri* en el flujo xilemático de

*Quercus rotundifolia*. ORUS *et al.* (1981a) estudiaron los efectos de la inclusión de las sustancias liquénicas aisladas de *Evernia prunastri* (los ácidos evérnico y úsnico, atranorina y cloroatranorina) y llegaron a observar que, en condiciones de laboratorio, estas sustancias liquénicas interfieren en procesos fisiológicos foliares de fitóforo como la inhibición de la actividad fotolítica como consecuencia de la quelación del manganeso cloroplástico. Semejantes experimentos tuvieron como resultados la alteración del metabolismo del almidón provocada por una carencia energética (ORUS *et al.*, 1981b) y envejecimiento de los tejidos foliares, detectado a diferentes niveles (ASCASO *et al.*, 1981).

ASCASO *et al.* (1983) estudiaron la relación entre la pérdida de capacidad fotosintética y desfoliación, tratando los cloroplastos de *Quercus rotundifolia* con las sustancias liquénicas de *Evernia prunastri* y observaron que presentan estroma y grana irregulares con frecuente pérdida o ruptura de las estructuras granales.

El efecto de una densa población de epífitos dominada por *Evernia prunastri* sobre cloroplastos foliares de *Quercus pyrenaica* y *Quercus rotundifolia* mediante microscopio electrónico de transmisión y análisis de imagen, fue estudiado por ASCASO y RAPSCH (1986a), quienes demostraron que la presencia de dichos epífitos disminuye el contenido foliar de clorofilas hasta un 50 % aproximadamente así como aumenta de forma notable el contenido de almidón, del orden de dos veces superior en roble y 10 veces superior en encina respecto a los controles sin epífitos. En el mismo año ASCASO y RAPSCH (1986b) llegaron a constatar que la incubación con ácido evérnico deprime todas las relaciones estructurales del cloroplasto analizadas como el área, perímetro, porcentaje de almidón, número de plastoglobúlos, grana por cloroplasto y tilacoides por grana.

Sin embargo, los resultados logrados por AVALOS *et al.* (1986) demostraron que en ramas de *Quercus pyrenaica* cubiertas por *Evernia prunastri*, el ácido evérnico es acrópetamente translocado a través de los vasos xilemáticos hasta alcanzar el nervio principal de las hojas, pero este ácido fenólico no fue detectado en el mesófilo de las hojas.



El efecto sobre el número y la velocidad de desarrollo de yemas foliares de *Quercus pyrenaica* soportando poblaciones de *Evernia prunastri* y *Parmelia sulcata* fue estudiado por LEGAZ *et al.* (1988) comprobando que tanto las ramas primarias como secundarias que soportan epífitos forman menos yemas y, de éstas, se desarrollan menos hojas y más tardíamente que aquellas libres de epífitos. Aquellas yemas retrasadas contienen discretas cantidades de ácido evérnico sustancia líquénica que ha podido ser aislada y caracterizada de dichas yemas, tanto por HPLC como por espectro IR (VICENTE, 1988). Semejantes resultados fueron logrados por MONSÓ *et al.* (1993) que llegaron a constatar que la acumulación del ácido evérnico en yemas apicales de ramas de *Betula pendula* Roth. puede inhibir el crecimiento apical de las ramas y la aparición de hojas, en el mismo sentido de lo descrito por LEGAZ *et al.* (1988) trabajando con *Quercus pyrenaica* Willd.

## 1.2. FISIOLÓGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA DESFOLIACIÓN

ASCASO *et al.* (1983) observaron unas alteraciones ultraestructurales en cloroplastos de hojas de *Quercus rotundifolia* después de incubarlos con componentes naturales aislados de *Evernia prunastri*. VICENTE y ESTEVEZ (1976) estudiaron la acción de cloroatranorina en la inhibición de fotólisis por quelación de  $Mn^{2+}$ . ORUS *et al.* (1981a) encontraron que las sustancias líquénicas, aisladas de *Evernia prunastri* y suministradas, bajo condiciones de laboratorio, a extremos apicales de ramas de encina cortadas y portando hojas, inhiben la fotorreducción del DCPIP y lo hacen a una velocidad 10 veces menor que aquellos procedentes de ramas no tratadas. Sin embargo, la reacción de HILL fue completamente restaurada cuando los cloroplastos deficientes fueron incubados con  $MnCl_2$ . El presumible déficit de  $Mn^{2+}$  cloroplástico, causado por fenoles, fue confirmado mediante la valoración del catión por espectrofotometría de absorción atómica, lo que confirmó que las sustancias líquénicas absorbidas, en la zona de corte, debían ser translocadas a las hojas donde, quelando el  $Mn^{2+}$  cloroplástico, determinarían la depresión fotosintética. Experimentos semejantes fueron reproducidos por INOUE *et al.* (1983) usando cloroplastos aislados de hojas de *Quercus mongolia* que procedían de ramas incubadas en bicarbonato 1mM que contenía ácido úsnico 40  $\mu M$  en acetona al 2%. Al cabo de 7 días, la actividad de los cloroplastos en la

fotorreducción de DCPIP decreció al 20% de la actividad control, siendo parcialmente restaurada por adición de  $\text{MnCl}_2$ . Un fenómeno semejante fue observado cuando se midió la fotoproducción de oxígeno usando ferricianuro como aceptor de electrones. El ácido úsnico inhibía fuertemente el desprendimiento de oxígeno, el cual era parcialmente restaurado por adición de  $\text{MnCl}_2$  0,2 mM. Estos resultados fueron más tarde refrendados por INOUE *et al.* (1987), aunque LASCÈVE y GAUGAIN (1990) trabajando con plántulas de girasol y maíz, y VAVASSEUR *et al.* (1991), usando protoplastos de células mesofílicas de *Commelina communis*, encontraron que la reversión de la inhibición de la fotólisis por adición de  $\text{Mn}^{2+}$  no era posible. La inhibición de la fotosíntesis en estas plantas parecía deberse a un cierre parcial de los estomas producido por el ácido úsnico lo que recundariamente inhibía el flujo de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, INOUE sugiere la existencia de varios problemas. Uno de ellos consiste en que los efectos inhibitorios del ácido úsnico dependían de la edad de las hojas, ya que el éxito en los experimentos se lograba usando ramas jóvenes, pero no sucedía en ramas viejas. Otro problema radicaba en que los resultados obtenidos con roble no eran reproducibles usando hojas de espinaca. La acción del ácido úsnico podía ejercerse tanto en el centro reductor como en el oxidante del PSII, dado que la fluorescencia de las clorofilas aumentaba en periodos cortos de iluminación y disminuía en el estado estacionario, en cloroplastos tratados respecto de los usados como control. Esto puede interpretarse, en el sentido antes apuntado, como una inhibición semejante a la inhibición lograda con herbicidas de la familia de la atrazina o del DCMU (PFIOSTER *et al.*, 1981). Esta suposición se ve reforzada por ácido úsnico cuando se usan cloroplastos de espinaca insensibilizados frente a DCMU, siendo así que la misma concentración del fenol causa un 50% de inhibición del proceso en cloroplastos no insensibilizados (INOUE *et al.*, 1983).

Un punto interesante concierne a la metodología empleada. La unión de  $^{14}\text{C}$ -atrazina a la proteína asociada a la plastoquinina B, ( $\text{Q}_\text{B}$ ), entre el aceptor primario y el bloque de plastoquinonas, envuelve el mismo número de moléculas de clorofila, tanto en tilacoides aislados de cloroplasto como en aquellos aislados de cloroplastos deprimidos en su contenido en bicarbonato o, incluso, en estos últimos cuyo nivel de bicarbonato ha sido artificialmente restaurado (KAHNNA *et al.*, 1981). En los tres casos, un sitio de unión para el herbicida conlleva 500 moléculas de clorofila. Sin

embargo, sí cambian sensiblemente los valores de la constante de afinidad en los tres casos. Estos valores han sido estimados en  $3,4 \cdot 10^{-8}$ ,  $1,2 \cdot 10^{-7}$  y  $4,8 \cdot 10^{-8}$ M, respectivamente. Esto implica que, en las muestras deprimidas en bicarbonato, la afinidad de atrazina por su centro de unión se ve sensiblemente reducida. Parece que la falta de bicarbonato puede cambiar la concentración de la proteína a la que se une el herbicida cerca del centro reductor del PSII, conduciendo esto a un cambio en la afinidad de la proteína por su ligando. Después de adición de bicarbonato a los tilacoides deprimidos en dicho anión, se restaura la afinidad por la atrazina y se hace comparable a la del control. Semejantes resultados han sido obtenidos para DCMU y para 4,6-dinitro-O-cresol (VAN RENSEN y VERMAAS, 1981; GOVINDJEE *et al.*, 1983).

Estos resultados ponen la cuestión en una doble disyuntiva:

- a) Si el ácido úsnico en particular, o los fenoles en general, tienen una acción desacoplante semejante a la de los citados herbicidas, el suministrarlos disueltos en bicarbonato sensibiliza a la proteína a  $Q_B$  frente a dichos fenoles.
- b) Cabría preguntarse si la disolución de fenoles utilizada en los experimentos de simulación es equiparable a la que, de una manera natural, puede encontrarse en el fluido xilemático del fitóforo.

### 1.3. MECANISMO DE LA FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS SUPERIORES

El conocimiento científico de las fuerzas que gobiernan el movimiento empezó hace casi 4 siglos con los descubrimientos de GALILEO, PASCAL, NEWTON y sus sucesores. Pero esas leyes que sólo trataron un terreno de energía, que es el movimiento de masas, no aportaron casi nada a la comprensión de la vida. Había que esperar la termodinámica, con CARNOT y JOULE, para que el concepto de energía deja atrás la noción de energía cinética y reúne poco a poco el calor, la luz y, de manera general, los rayos.

A partir de aquí, se podía explicar cómo los organismos vivos sobreviven gracias a la propiedad que tienen de convertir la energía captada de fuentes exteriores. Al principio de la vida había sólo una fuente de energía exterior: el Sol. Los organismos vivos más sencillos se contentaron usando los mejores rayos que cubrieron una muy larga banda en el terreno electromagnético.

El ejemplo de los vegetales muestra que el problema ha sido resuelto de manera satisfactoria, almacenando esa energía bajo forma química estable asegurando su vida y permitiendo a otras formas vivas de desarrollarse sin tener que capturar las radiaciones solares.

El proceso mediante el cual esos vegetales transforman la energía luminosa en energía química, que nos puede garantizar que la vida sobre la Tierra no llega a su fin por falta de energía, es a la vez distintivo y definitorio del reino vegetal, es la *fotosíntesis*. Este proceso biológico capacita al organismo para utilizar luz visible o infrarrojo-cercana como fuente de energía metabólica y que, por tanto, le permite nutrirse de compuestos minerales con bajo o nulo contenido energético.

La primera etapa de este proceso biológico consiste en la absorción de un fotón por un pigmento orgánico u organometálico (una clorofila o un carotenoide) que pasa a un estado electrónicamente excitado desde el que es posible iniciar una serie de transformaciones físicas y químicas específicas. Como resultado de tales transformaciones se producen reductores y estados ricos en energía (NADPH, ATP, etc.), y su segunda etapa consiste en la utilización de tales formas de energía por el anabolismo celular.

### 1.3.1. El cloroplasto funcional

Se define fotosíntesis al margen de la fotoergonia de *Halobacterium halobium* para significar que fotosíntesis implica no sólo formación de ATP acoplada a procesos fotoquímicos, sino también reacciones de reducción dependientes de la capacidad de formar nucleótidos de piridina, que serán empleados como cofactores por parte de

enzimas del metabolismo del carbono y del nitrógeno. Sobre esta base, la fotosíntesis requiere un donador de electrones, como es el agua en plantas superiores. Al producirse oxígeno tras la cesión de electrones a pigmentos fotooxidados, la fotosíntesis recibe el nombre de oxigénica, para diferenciarla de aquella que, como en bacterias, el donador de electrones es sulfuro o succinato y, por tanto, no conlleva despendimiento de oxígeno.

Los fotorreceptores fotosintéticos son siempre clorofilas *a*, a las que se asocian pigmentos accesorios, como carotenos, xantofilas y biliproteínas, para constituir fotosistemas.

#### 1.3.1.1. Constitución de fotosistemas para fotosíntesis oxigénica

Las clorofilas de lamelas cloroplásticas lavadas son muy resistentes a la extracción con tampones acuosos. Las membranas lipoproteicas son solubilizadas, sin embargo, con una amplia variedad de detergentes, como desoxicolato, sin embargo, Triton X-100, dodecil sulfato sódico, etc. Mediante estos tratamientos, pueden separarse distintos complejos clorofila-proteína que pueden ser posteriormente caracterizados en SDS-PAGE. Se observan seis bandas distintas que contienen clorofila, pero pueden agruparse en tres únicos y diferentes complejos clorofila-proteína, además de definir la séptima banda como un artefacto formado por la interacción entre el detergente y la clorofila. Las bandas CP1a y CP1 sólo contienen clorofila *a* junto con P700, el centro de reacción del fotosistema I (PSI). Las bandas LHCP contienen clorofilas *a* y *b* casi en idéntica proporción, y su función la de acumular energía (Light-Harvesting-Chlorophyll-Protein complexes). La banda CP4 contiene sólo clorofila *a*, pero su máximo de absorbancia en el rojo está desplazado hacia longitudes de onda más cortas que las encontradas como dominantes en CP1 y CP1a, por ello, parece estar asociada al centro de reacción del fotosistema II (PSII).

Los complejos clorofila-proteína que integran el PSII han podido ser aislados y caracterizados a partir de cierto número de plantas superiores (BASSI y SIMPSON, 1989b). Membranas de maíz que contienen PSII han sido solubilizadas con

octilglucósido y han podido ser analizadas en electroforesis no desnaturizante. El denominado complejo LHCI-680 es disociado en SDS-PAGE en dos polipéptidos de 20 y 25 kDa de masa molecular. Su máximo de absorción está localizado a 669 nm, emitiendo fluorescencia con un máximo a 680 nm. El complejo  $\text{Chl}_{a/b}$ -P2 también está compuesto por dos polipéptidos de masa molecular muy cercana, 28 y 29 kDa, con un máximo de absorción a 671 nm y un máximo de fluorescencia a 680 nm. Un solo polipéptido parece estar formando el complejo denominado  $\text{Chl}_{a/b}$ -P1, de 31 kDa de masa molecular, con características espectrales muy semejantes a las dos anteriormente citadas. La mayor banda, denominada  $\text{Chl}_{a/b}$ -P2\*\*, cuya masa molecular en condiciones no desnaturizantes se ha estimado en 143 kDa, disocia en SDS-PAGE en cinco bandas polipeptídicas de 26; 28,5; 28,8; 29,5 y 30 kDa. Su máximo de absorción está en 674 nm, emitiendo fluorescencia a 680 nm. Todos estos complejos clorofila-proteína están compuestos por ambas formas del pigmento, *a* y *b*, con razones que varían desde 1,2 para  $\text{Chl}_{a/b}$ -P2\*\* a 2,5 para el complejo  $\text{Chl}_{a/b}$ -P1.

Además de los descritos, se han aislado complejos que sólo contienen clorofila *a*. los complejos denominados  $\text{Chl}_a$ -P2 y  $\text{Chl}_a$ -P3 están asociados claramente al centro de reacción. Este último ha sido preparado tanto a partir de espinaca como de maíz. En su forma de máxima desociación consta de 5 polipéptidos. El de mayor tamaño,  $\text{Chl}_a$ -P2, de unos 45 kDa, contiene clorofila *a*. dos polipéptidos, denominados  $D_1$  y  $D_2$ , de masas moleculares entre 29 y 36 kDa, parecen asociarse a transportadores (KLEIN *et al.*, 1993). Las dos últimas bandas corresponden a un citocromo  $b_{559}$ , de 9 kDa, y un pequeño péptido de 4 kDa. Este complejo es capaz de transportar electrones desde la 1,5-difenilcarbácida al DCPIP.

Sin embargo, una mayor desagregación se ha logrado usando PSII de espinaca. El complejo, que es básicamente idéntico al de maíz, separa una fracción más simple, compuesta exclusivamente por los péptidos  $D_1$  y  $D_2$ , así como de citocromo  $b_{559}$ . El análisis por HPLC de esta partícula, considerada como fotocentro del PSII, revela que contiene 5 moléculas de clorofila *a*, dos de feofitina *a*, una molécula de  $\beta$ -caroteno y una de citocromo  $b_{559}$ . Este complejo, purificado, no fotorreduce DCPIP a partir de 1,5-difenilcarbácida, pero muestra cambios drásticos de absorción tras iluminación en presencia de metil viológeno y ditionito. Un pico negativo a 682 nm en el espectro

diferencia luz – oscuridad revela la presencia de P680, mientras que el pico positivo a 450 nm puede interpretarse como acumulación de feofitina reducida.

Cuando la disociación de PSII de maíz por octilglucósido se lleva a cabo en presencia de  $Mg^{2+}$  y en gradiente de sacarosa, se separan tres bandas que indican estabilidad interna de subcomplejos. El  $Mg^{2+}$  es requerido para la asociación de los complejos  $Chl_{a/b}$ -P2 y  $Chl_{a/b}$ -P3, así como para la asociación de  $Chl_{a/b}$ -P2\*\* a  $Chl_a$ -P3.

La caracterización del PSI ha podido ser realizada usando membranas enriquecidas en tal fotosistema, aisladas de lamelas por una disociación convencional con Triton X-100 (BASSI y SIMPSON 1989a). El complejo no disociado migra de una manera anómala en PAGE, pero su electroforesis desnaturizante revela la existencia de tres bandas mayoritarias. Sus características espectrales dan máximos de absorción a 674 nm (fluorescencia a 690 nm), 677 nm (fluorescencia a 730 nm) y 680 nm (fluorescencia a 720). Estos complejos, aislados de cebada, son denominados con las siglas LHCI-680, LHCI-730 y P700- $Chl_a$ -P1, respectivamente.

Cuando la cantidad de Triton X-100 usada para la extracción disminuye, un típico complejo LHCII aparece, aunque no hay contaminación con PSII. Este complejo sólo es funcional en PSI si LHCI-680 está presente.

En *Lemna gibba*, sin embargo, un solo complejo LHCI ha sido encontrado tras solubilización de PSI con nonilglucósido. Este complejo lleva un solo polipéptido asociado, de 24 kDa de masa molecular.

Una importante cuestión es si PSI puede existir en ausencia de su fotocentro o viceversa. Se han descrito varios mutantes, tanto de algas como de fanerógamas, a los que le faltan, bien los complejos clorofila-proteína, bien P700, bien la actividad del PSI. Algunos de estos mutantes deficitarios son mutantes de plastoma lo que, unido a la inhibición de la síntesis de los complejos por cloranfenicol, indica que los polipéptidos de estos complejos son codificados por DNA cloroplástico. No obstante, también se han descrito mutantes mendelianos de complejos clorofila-proteína para el PSI, por lo que en su síntesis parece existir una acción combinada nucleo-plastidio.

Los complejos LHC (o LHCP) se encuentran en todos los grupos de vegetales en los cuales la clorofila *b* es pigmento accesorio (KÜHLBRANDT, 1994). Estos complejos nunca contienen centros de reacción (P680 ó P700) y su única función es colectar luz. Los polipéptidos de menor tamaño molecular encontrados en estos complejos son de 24-30 kDa aunque, subsidiariamente, pueden formar oligómeros. Después de la disociación de la clorofila, la apoproteína suele separarse en dos péptidos principales, de 23 y 25 kDa. A veces aparece uno secundario, cuya masa molecular es de 28 kDa. La razón a/b media para plantas superiores es de 1,3. Una fuerte banda negativa en el espectro de dicroísmo circular a 650 nm ha sido interpretada como indicativo de la existencia de un cuerpo central de clorofila *b* dentro de los límites del complejo que involucra la separación de carga, mientras que las moléculas de clorofila *a* forman la parte externa del complejo.

#### 1.1.3.2. Topografía funcional de las lamelas tilacoidales

La técnica de criofractura aplicada a las lamelas tilacoidales resuelve su superficie en dos caras, una externa, denominada PS, y otra interna, denominada EF. La superficie que delimita al lóculo tilacoidal también puede ser resuelta en dos caras, una externa, ES, y otra interna PF. El fraccionamiento de estas membranas con digitonina proporciona partículas PSI y PSII. Cuando estas partículas son sometidas a criofractura, PSI muestra estructuras semejantes morfológicamente en la cara PF de la membrana tilacoidal, mientras que la morfología de las partículas PSII muestra ser idéntica a la de las inclusiones encontradas en la cara EF.

Las partículas localizadas en la cara EF oscilan entre los 8 y 20 nm, con máximos aproximados entre 11-16 nm. Se ha demostrado que, en cloroplastos enverdeciendo, sólo aparecen las mayores partículas después de tiempos prolongados de exposición a la luz, situación también observada para el cloroplasto de *Euglena*. los experimentos realizados con plantas sometidas a la iluminación intermitente demuestran que los cloroplastos se desarrollan con déficit en la clorofila *b* y complejos LHCP. Tampoco diferencian grana en abundancia y el tamaño máximo que alcanzan las partículas de la cara EF (PSII) no sobrepasa los 8,3 nm. Cuando estas mismas plantas



son transferidas a iluminación continua, aumenta considerablemente el número de grana y aunque la densidad de partículas aumenta muy poco, su tamaño medio se sitúa entre 10,5 y 16,4 nm. Durante este periodo se forman los complejos LHCP y se postula que estos complejos se unen, en cantidades variables, a un corazón básico para formar las partículas características de la cara EF.

Durante el curso de envejecimiento bajo iluminación intermitente, las partículas encontradas sobre la cara PF también incrementan ligeramente de tamaño en la membrana tilacoidal. Su diámetro aumenta de 7,0 a 7,7 nm, lo que sugiere la adición de algún componente específico. Cuando las plantas son transferidas a iluminación continua, las lamelas tilacoidales poseen partículas cuyos diámetros medios son 8,1 y 11,8 nm. Aunque se estima que las lamelas estromáticas no poseen partículas identificadas con PSII, una cierta actividad de tal sistema puede ser observada cuando tales lamelas se ensayan en condiciones de alta intensidad de iluminación, lo que implica pequeñas cantidades de PSII, posiblemente asociadas a las partículas de 11,8 nm.

Se posee poca información sobre la estructura molecular de las partículas intergranales en plantas superiores. No obstante, existe un detallado análisis de las membranas de *H. halobium*. Estas membranas contienen un polipéptido sencillo, la bacteriorrodopsina, de 26 kDa, que está embebido en una bicapa que puede ser crio fracturada. Esta técnica revela partículas intermembranales agrupadas en un enrejado hexagonal, con un espaciamiento de 6,1 nm. Estudios de difracción óptica y reconstrucción de imagen demuestran que cada partícula está compuesta por tres moléculas de bacteriorrodopsina, unos 12 polipéptidos por cada partícula de 6,1 nm. MILLER ha sometido algunas partículas de la cara EF granal de cloroplastos de espinaca a difracción óptica y reconstrucción de imagen. Mediante estas técnicas se ha demostrado la existencia de cuatro subunidades por partícula, con indicaciones de otra subestructura dentro de cada subunidad.

### 1.3.1.3. Clorofilas de plantas superiores

Sin duda, las *clorofilas* forman el grupo más importante de los pigmentos fotosintéticos, tanto cualitativa como cuantitativamente. Estructuralmente estos pigmentos son porfirinas, es decir, están constituidas por un anillo tetrapirrólico formado por cuatro pirroles asociados en posición  $\alpha$ . Las moléculas de clorofila presentan en el centro del anillo un átomo de magnesio quelado por los nitrógenos pirrólicos. Los dobles enlaces se presentan, prácticamente, conjugados, de donde su entidad como pigmentos. A través de un enlace éster con un resto propiónico en el anillo IV, se encuentra unido un largo brazo hidrofóbico de naturaleza terpenoide con veinte átomos de carbono que recibe el nombre de fitol. La zona visible del espectro es la zona de absorción de todas las clorofilas que además presentan dos bandas de absorción, la primera llamada banda de Soret, en el azul violeta (máximo entre 430 y 440 nm) y la segunda banda en el rojo y rojo lejano (entre 640 y 720 nm). Las clorofilas son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como alcohol o acetona.

La clorofila *a* esta presenta en todos los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica. Existen también otras clorofilas (*b*, *c*, *d*, *e*. etc.), pero la clorofila *b* junto a la *a* son las más conocidas y las de más amplia distribución, mientras que las clorofilas *c*, *d* y *e* se encuentran en algas junto a la *a*.

Las formas más fluorescentes de la clorofila *a* son las que absorben a longitud de onda más corta (entre 650 y 680 nm). Estas constituyen predominantemente la antena del PSII, mientras que las que absorben a longitud de onda más larga (mayor de 680 nm) se encuentran en el PSI. Las clorofilas *b*, *c* y *d* forman con los restantes de la clorofila *a* los pigmentos accesorios, siendo muy eficientes captadores de luz.

Los pigmentos fotoactivos de los centros de reacción de los fotosistemas I y II son moléculas especializadas de clorofila *a*, conocidas respectivamente como P680 y P700.

Cuando por hidrólisis, sobre todo alcalina, se separa el fitol, la estructura resultante recibe el nombre de *clorofilida*. Sin embargo, la *feofitinización* es producto de

una ruptura de los enlaces que unen el centro del anillo tetrapirrólico al magnesio, y la liberación de este último en el medio, por acidificación.

## 1.4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

### 1.4.1. Consideraciones generales y desarrollo histórico

Las hormonas vegetales constituyen grupos de sustancias que se encuentran naturalmente en las plantas. Son compuestos orgánicos sintetizados por la planta misma y actúan a baja concentración. Los procesos influidos consisten principalmente en el crecimiento, diferenciación y desarrollo; sin embargo, otros procesos tal como los movimientos de las células de guarda pueden ser afectados por reguladores.

El descubrimiento de las sustancias reguladoras del crecimiento fue indirectamente señalado en publicaciones independientes en el siglo XVIII. Al eliminar un anillo de corteza de la parte superior de un tronco, DUHAMEL de MONCEAU, en 1758, observó que se producía un hinchamiento y se formaban raíces pero nada de esto ocurría en la parte inferior del anillo. Años después SACHS (1880 a,b), para dar una justificación a esta observación, propuso que habría una migración basípeta de las sustancias responsables de la formación de raíces desde el lugar de su producción, que es la hoja, hacia los tallos. Habría que esperar 50 años más para que la observación de DUHAMEL tuviese la interpretación correcta al relacionarla con la existencia de fitohormonas.

El concepto de hormonas vegetales o fitohormonas empieza verdaderamente con los experimentos de DARWIN quién publicó en 1880 una obra bajo título "*El poder de movimientos en plantas*" donde demostró que el ápice del coleóptilo de las gramíneas era el responsable de que las plántulas se curvasen hacia la luz. Estos resultados fueron apoyados por BOYSEN JENSEN quien, en 1910, realizó experimentos que llevaron a pensar que el estímulo era de naturaleza química. Pocos años después, PAAL (1918) propuso que había una sustancia estimulante del crecimiento excretada por el ápice que se difundía de forma simétrica en oscuridad y asimétrica cuando se ilumina lateralmente

el coleóptilo, haciendo crecer la zona más oscura. La idea de PAAL fue confirmada por SÖDING (1931) en experimentos en que medía el crecimiento lineal de coleóptilos cuando tenían o no el ápice.

Después de haber sido confirmada, por varios autores, la existencia de una sustancia reguladora del crecimiento vegetal sintetizada en el ápice del coleóptilo, llegó la hora de aislarla y caracterizarla. Fue WENT, en 1928, quién logró aislarla. Siete años después, CHOLODNY (1935) realizó experimentos clave para obtener grandes cantidades de esta sustancia a partir de semillas embebidas que habían germinado parcialmente. Las cantidades de esta sustancia reguladora del crecimiento vegetal oscilan entre 1 y 100  $\mu\text{g}$  por Kg de peso seco, aunque con las modernas técnicas de extracción y corrección de las pérdidas a lo largo del proceso los valores máximos en algunos tejidos pueden ser tres veces mayores.

#### **1.4.2. Auxina**

##### **1.4.2.1. Descubrimiento y localización**

Las *auxinas* fueron las primeras hormonas del crecimiento vegetal que se descubrieron pocos años después de la caracterización por BERHOLD, en 1862, de la primera hormona animal *testosterona*. El término *auxina* tiene un origen griego, “auxésis”, que significa elongación celular. La elongación celular de tallos o coleóptilos aislados, inducida por auxinas, es una de las respuestas hormonales más rápidas en plantas. La respuesta llega 10 min después de la adición de la auxina, resulta en 5-10 veces de aumento en la razón del crecimiento y persiste horas o incluso días (EVANS, 1985).

Utilizando el test de epicótilo de guisante para la localización de la auxina en los distintos órganos, se ha notado que en la plántula de trigo existe alto contenido en el ápice del coleóptilo y va disminuyendo a medida que se desciende a lo largo del mismo, alcanzándose el mínimo en la base y un incremento a medida que se progresa hacia el ápice de la raíz, siendo el valor en este punto menor que el que existe en el ápice del coleóptilo.

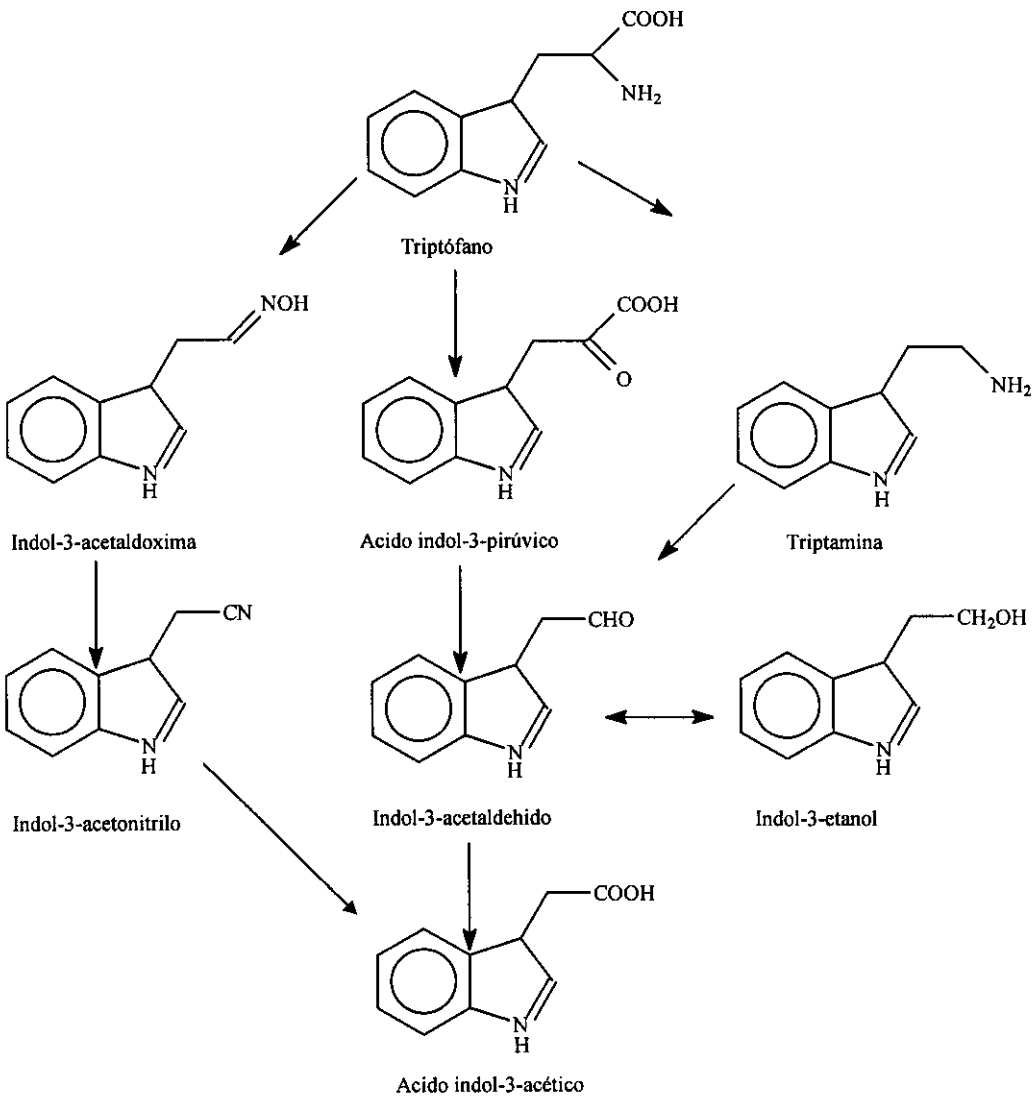
#### 1.4.2.2. Relación entre estructura y actividad

Recientemente, y trabajando sobre la estructura de la auxina, KATECKAR y GEISSTER (1982) han llegado a determinar los dominios químicos responsables de la actividad de la hormona. Estos incluyen un dominio carboxílico y dos correspondientes a los anillos aromáticos. El dominio carboxílico debe de estar formado por un carbono metilénico separado del dominio planar aromático (THIMANN y LEOPOLD, 1955). Sin embargo, COHEN *et al.* (1985) han demostrado que un grupo de ácido sulfónico puede sustituir al grupo carboxílico. En la actualidad, los estudios están muy concentrados sobre la relación estructura-actividad para lograr la síntesis de nuevos reguladores de crecimiento con actividad auxínica.

#### 1.4.2.3. Biosíntesis en plantas superiores

Los estudios de los últimos 50 años concuerdan todos en que la auxina se sintetiza a partir del triptófano. Las vías de síntesis del AIA se basan en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vivo* estos intermediarios en AIA. En algunas especies, la conversión de triptófano predomina durante las primeras etapas del crecimiento normal en maíz, lenteja de agua y *Arabidopsis* (BIALEK y COHEN, 1992). La formación de auxina a partir de triptófano se estudió *in vivo* e *in vitro* en más de 20 plantas mediante preparaciones enzimáticas y estudios de la conversión del triptófano marcado en  $^{14}\text{C}$  en auxina (SCHNEIDER y WIGHTMAN, 1978; SEMBDENER *et al.*, 1980). Sin embargo, había dificultades en los estudios de la síntesis de AIA a partir de triptófano. Primero, las cantidades del triptófano están mucho más altas que las de AIA (SCHNEIDER y WIGHTMAN, 1978) y, segundo, simplemente secando el triptófano radiomarcado se produce AIA con un rendimiento del 30% (EPSTEIN *et al.*, 1980).

Para la regulación de la síntesis de AIA, sobre todo, procediendo de un precursor que se encuentra en altas concentraciones, las plantas pueden usar como precursor de auxina el esteroisómero no proteico del triptófano, el *D*-triptófano, que no está implica-



**Fig. 3. Rutas de síntesis del ácido indol-3-acético a partir del triptófano propuestas en las plantas superiores**

do en la biosíntesis de AIA en brotes de lenteja de agua o de tomate (BALDI *et al.*, 1991; COONEY y NOHEBEL, 1991). Sin embargo, REKOSLAVSKAYA (1986) observó que en cultivos celulares de tomate y soja, el *N*-malonil-*D*-triptófano y el *D*-triptófano se convierten en AIA. En cebada se produce una mayor conversión de *D*-triptófano a AIA, que el *L*-triptófano a AIA (TSURUSAKI *et al.*, 1990).

En fin, existe también una ruta de biosíntesis del AIA en la que no interviene el triptófano, esta ruta fue señalada por WRIGHT *et al.* (1992) y confirmada también por BANDURSKI *et al.* (1992), en experimentos donde se utilizó el antranilato marcado con  $^{15}\text{N}$  y que confirmó que la biosíntesis no está relacionada con el triptófano.

#### **1.4.2.4. Los conjugados de la auxina**

##### **1.4.2.4.1. Descubrimiento de los conjugados**

En 1934, THIMANN fue el primero en sugerir que una parte de auxina se encuentra bajo forma conjugada. Un año después, CHOLODNY (1935) demostró por primera vez la existencia de conjugados de auxina, al observar que trozos de endospermo de semillas embebidas en agua colocadas sobre un coleóptilo de avena inducían un crecimiento más grande en la parte donde se ha colocado el endospermo. Después observó que se lograba más crecimiento con semillas embebidas en agua que en alcohol. El mismo autor fue capaz de concluir que la concentración de auxinas conjugadas es mucho mayor en semillas que en tejidos de avena, maíz y otras gramíneas. Fue, probablemente, el primero en observar la hidrólisis enzimática de conjugados de auxina en auxina libre. Sin embargo no llegó a ninguna conclusión. POHL (1935), LAIBACH y MEYER (1935), HATCHER y GREGORY (1941), HATCHER (1943 y 1945), y AVERY *et al.* (1940) continuaron estos estudios y demostraron que la hormona de la semilla era probablemente la misma que la encontrada en la parte superior del coleóptilo y que las reservas en la semilla de esa hormona decrecientan durante la germinación de la semilla. HEYN (1935) y SKOOG (1937) demostraron que la separación del endospermo de la semilla tiene más respuestas

que la auxina exógena y impide la regeneración de la dominancia apical. SKOOG (1937) atribuyó eso a la existencia de un sitio de almacenaje en la semilla de la del precursor de la hormona que será convertida en auxina después de transportarlo al ápice. OVERBEEK (1938) fue quién demostró que sólo el 5% de auxinas se encuentra bajo forma disponible y concluyó que la mayor parte de auxinas en plantas se encuentra conjugada en forma de precursores.

En todas las plantas estudiadas, la mayor parte de la auxina se encuentra en forma conjugada, como ésteres en el caso de algunos cereales (COHEN y BANDURSKI, 1982) o como auxina unida a amidas en las plantas dicotiledóneas. Los estudios de BANDURSKI y SCHULZE (1974) indican que al menos el 95% de auxina en el tejido joven de brotes de cereales se encuentra en forma de éster.

#### 1.4.2.4.2. Hidrólisis de los conjugados de la auxina

Durante el crecimiento de la plántula y también durante el crecimiento rápido que se produce en respuesta a un estímulo ambiental, los conjugados de la auxina pueden hidrolizarse para producir auxina libre (BANDURSKI y SCHULZE, 1977).

Durante la germinación de *Zea mays* hay una enorme bajada de conjugados de auxina en el grano (CORCUERA, 1967; UEDA *et al.*, 1970). UEDA y BANDURSKI (1974) observaron que AIA-mio-inositol, AIA-mio-inositol glicósidos y AIA-glucano en maíz, todos desaparecen en razón de casi un 1% por hora durante las primeras 96 horas de germinación. Entonces la pregunta era: Cuando los conjugados de AIA desaparecen, ¿son primero hidrolizados para producir AIA libre y es el AIA libre después usado o destruido?

La respuesta a tal pregunta vino de los estudios de EPSTEIN *et al.* (1980) quienes demostraron que el nivel de auxinas en el endospermo es constante y se ha concluido que, en 3 horas, la semilla debía preparar una cantidad de auxina igual a la que inicialmente estaba presente en la semilla. La pregunta ahora es: ¿Cómo la cantidad de auxina permanece constante? Entonces debe haber una fuente para la nueva auxina.



Los estudios de EPSTEIN *et al.* (1980), UEDA y BANDURSKI (1969), PISKORNIK y BANDURSKI (1972), llevaron a concluir que la auxina producida en el momento de la germinación de almendra tiene como fuente los conjugados de auxina y no el triptófano. HAMILTON *et al.* (1961) observaron que la extracción de tejidos de semilla con acetona acuosa (un disolvente que podría desnaturalizar las enzimas) produce poco o nada de AIA libre mientras que la extracción de tejidos con éter (un disolvente que podría destruir membranas y autolíticamente libera enzimas) produce auxina. La hidrólisis alcalina también produce auxina (HAMILTON *et al.*, 1961). Los descubrimientos de THIMANN (1934) condujeron al uso de cloroformo y éter como disolventes mejores para la extracción de la auxina.

Los estudios sobre los conjugados de la auxina en maíz demostraron que el principal éster de AIA es el AIA mio-inositol, que se encuentra tanto en la semilla como en el brote donde se puede hidrolizarse produciendo AIA.

BANDURSKI *et al.* (1990), usando el método de marcaje radioactivo, observaron que la hidrólisis del AIA-mio-inositol se producía con la suficiente rapidez como para cubrir las necesidades del brote en crecimiento.

Recientemente, BANDURSKI *et al.* (1992) encontraron una secuencia de reacciones que podrían proporcionar un mecanismo de hidrólisis de un conjugado que se origina en la semilla, para formar AIA libre en el brote vegetativo y que podría ser la siguiente: el AIA-mio-inositol se transporta desde la semilla al ápice de brote, allí se transforma en AIA-glucosa; este último se hidroliza para liberar AIA libre que es transportado por el floema hacia abajo (GOLDSMITH, 1977) a través del brote (YAHALOM *et al.*, 1991). En fin, BANDURSKI *et al.* (1992) sugirieron que podía existir un movimiento regulado de AIA hacia el exterior de la estela o cilindro central para alcanzar las células receptoras del parénquima cortical y la epidermis del brote.

#### 1.4.2.5. Oxidación de la auxina

El catabolismo del AIA puede realizarse mediante dos vías: la oxidación descarboxilativa de la cadena lateral y la oxidación no descarboxilativa en las

posiciones 2 y 3 del anillo indólico.

La inactivación del AIA en las plantas puede ser una manera de regulación de su concentración por reducción de sus niveles. A veces, la inactivación del AIA puede lograrse mediante conjugación del AIA con otras moléculas como azúcares, aminoácidos e incluso proteínas y otras macromoléculas.

#### 1.4.2.5.1. Oxidación descarboxilativa

La ruta de esta oxidación está catalizada por peroxidasa en numerosas especies y, a veces, por varios isoenzimas en la misma especie.

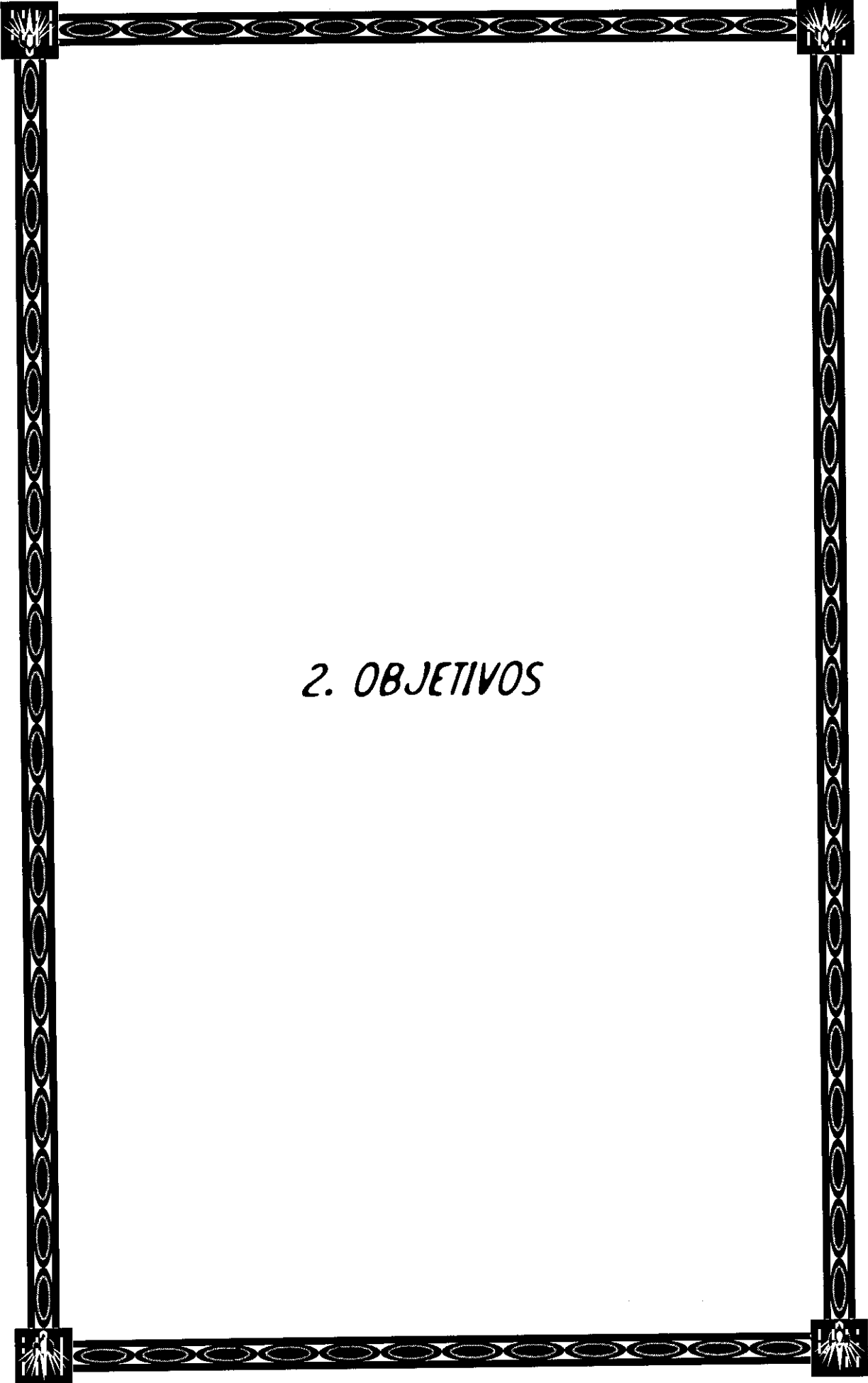
En 1947, TANG y BONNER encontraron una enzima capaz de catalizar la oxidación de AIA, AIA-oxidasa, que generalmente tiene las características de peroxidasas y es ahora conocida su distribución en plantas superiores (SCHNEIDER y WIGHTMAN, 1974). Los productos mayores de la acción de la AIA-oxidasa son 3-hidroxiacetiloxindol (HINMAN y LANG, 1965) y el ácido indol-3-carboxílico, respectivamente (SEMBDNER *et al.*, 1980).

La descarboxilación de AIA puede tener lugar sin añadir cofactores con peroxidasa de rábano; sin embargo, la presencia de  $Mn^{2+}$  y monofenoles tales como el ácido *p*-cumárico aumentan la velocidad de la reacción. Los dos fenoles *o*- y *p*-dihídrico (ej. ácido cafeico) y polifenoles actúan casi siempre como inhibidores (SEMBDNER *et al.*, 1980). La presencia de agua oxigenada no siempre es necesaria, aunque acorta el tiempo de oxidación de AIA. La estequiometría de la reacción es un mol de oxígeno consumido por un mol de AIA destruido. Una alta relación enzima-sustrato con un pH 6 favorece la formación de 3-metilenoxindol, mientras que indol-3-aldehído es el mayor producto a pH 4 y con proporciones estequiométricas de AIA y peroxidasas. La presencia de  $Mn^{2+}$  y 2-4-diclorofenol también favorece la formación de indol-3-metanol, que, por acción de la propia peroxidasa, pasa a indol-3-aldehído.

#### 1.4.2.5.2. Oxidación no descarboxilativa

La oxidación no descarboxilativa ha sido observada en varias plantas. Aún no se conoce bien el papel de las enzimas que participan en el proceso. Está claro que los cofactores de la reacción de descarboxilación no intervienen en este tipo de oxidación. EPSTEIN *et al.* (1980) mostraron que solamente alrededor de un 10% del recambio de AIA se puede explicar por descarboxilación. Se descubrió que en el pino existía una actividad enzimática que produce indol-3-metanol a partir de AIA marcado radiactivamente a protoplastos. El indol-3-metanol aparece solamente como un catabolito muy minoritario (SUNDBERG *et al.*, 1985).

En fin y para ver la importancia de este tipo de oxidación, WALDRUM y DAVIES (1981) observaron que la degradación peroxidativa del AIA es proporcional al número de secciones en que se troceaba el tejido y que la actividad descarboxilativa podía eliminarse lavando la superficie del tejido.



## *2. OBJETIVOS*

La antigua idea de que los líquenes epífitos no causan daño a los huéspedes está siendo actualmente criticada a la luz de los descubrimientos realizados en los últimos años. Muchos de los líquenes epífitos realizan un auténtico ataque parasitario sobre sus fitóforos gracias a la inyección de sustancias liquénicas en la savia xilemática. Estas sustancias liquénicas serían transportadas hasta las hojas provocando desfoliación, en mayor o menor extensión, según la densidad de cobertura sobre tronco y ramas.

La finalidad principal del presente trabajo se ha orientado a esclarecer el efecto de desfoliación provocado por los líquenes epífitos sobre especies de *Quercus*, tomando como modelo el caso de la relación entre *Evernia prunastri* (L.) Ach. y *Quercus rotundifolia* Lam., observada en El Pardo, Madrid, y también el caso de la relación entre *Parmelia hypoleucina* (J.) Stein. y *Quercus suber* L., observada en el Canal Zouada, provincia de Larache (Marruecos), donde, en ambos casos, las ramas con una densa población liquénica aparecen total o parcialmente desfoliadas, sin que aquello pueda ser atribuido a la edad de la rama. Este efecto es particularmente dramático en arbustos jóvenes, en los que la invasión por líquenes coincide con una atrofia del individuo. Sin embargo, ramas de los mismos árboles sin esa población liquénica presentan un follaje normal.

La desfoliación provocada por los líquenes epífitos se basa en dos supuestos principales:

- a) Las hifas liquénicas penetran hasta los haces conductores de las ramas del fitóforo.
- b) Los fenoles liquénicos pueden difundir a la disolución contenida en los haces vasculares y, en su seno, transportadas hasta las hojas, donde ejercerían su acción fitocida.

Sobre la base de estos dos supuestos descritos, la relación previamente establecida entre la pérdida de actividad fotosintética y desfoliación no parece posible. Al intentar establecer una relación entre presencia de epífitos y número y velocidad de

desarrollo de yemas foliares, se ha demostrado que tanto las ramas primarias como secundarias que soportan epífitos forman menos yemas y, de éstas, se desarrollan menos hojas y más tardíamente que aquellas que no muestran líquenes implantados. Aquellas yemas que podrían calificarse como retrasadas contienen cantidades discretas de los ácidos evérnico y úsnico, fenoles que han podido ser aislados y caracterizados a partir de dichas yemas.

El objetivo principal del presente estudio ha sido programado en las fases siguientes:

1. Estudio de la existencia de sustancias líquénicas en la savia xilemática de las ramas del fitóforo y su translocación hacia las hojas y las yemas.
2. Estudio del mecanismo de acción de las sustancias líquénicas sobre clorofilas extraídas de hojas del fitóforo.
3. Estudio de la posible conjugación entre sustancias líquénicas y auxinas del fitóforo como factor responsable del fenómeno de la defoliación.
4. Estudio de la posible inactivación de la peroxidasa por sustancias líquénicas y su influencia sobre los niveles de la auxina en el fitóforo.



### *3. MATERIAL Y MÉTODOS*

### 3.1. SELECCIÓN DE LOS ORGANISMOS

Por ser la especie arbórea más afectada y más dañada presentando estados de defoliación más avanzados en la zona de El Pardo de Madrid (España), se ha escogido la especie de *Quercus rotundifolia* Lam.

La especie epifítica que se ha usado como objeto de estudio por ser la posible responsable de la defoliación y por ser la especie más abundante que crece en las encinas ha sido *Evernia prunastri* (L.) Ach.

También se ha estudiado la especie epifítica *Parmelia hypoleucina* (J.) Stein. creciendo sobre la especie de *Quercus suber* en el Canal Zouada de la región de Larache (Marruecos) que nos sirvió como testigo del fenómeno de la defoliación causado por epífitos.

### 3.2. OBTENCIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH.

Las sustancias líquénicas han sido extraídas de talos de *Evernia prunastri* (L.) Ach. Estos talos han sido recogidos de troncos y ramas de *Quercus rotundifolia* Lam.

Se extraían las sustancias líquénicas del talo mediante lavados sucesivos con acetona pura (VICENTE, 1975) en el que están solubles las cuatro sustancias líquénicas de esta especie: ácido evérnico, ácido úsnico, atranorina y cloroatranorina. Previamente el talo había sido limpiado de polvo y desecado (el agua retenido por el talo puede causar la formación de emulsiones con la parte insoluble y así disminuye la capacidad de extracción).

La acetona era añadida en cantidades de 50 ml por cada g de talo seco, dejando secar éste entre lavado y lavado. La suma de los sucesivos lavados acetónicos, conteniendo la mezcla de las sustancias líquénicas se secó en corriente de aire. Las sustancias líquénicas se recuperaron como un polvo amarillo que se almacena en oscuridad a 4°C para sucesivos experimentos.



Las cuatro sustancias líquénicas de *Evernia prunastri*, ácido evérnico, ácido úsnico, atranorina y cloroatranorina usados como patrones cromatográficos, se adquirieron de la firma comercial SIGMA.

### 3.2.1. Análisis del extracto acetónico

#### 3.2.1.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC o CCF)

Se realizó en placas de cristal de 20x20 cm, empleando como adsorbente silicagel G-60 o HF<sub>256-366</sub> y como disolvente, benceno:dioxano:ácido acético glacial (90:25:4) de acuerdo con el método de RAMAUT (1963). Se prepararon cada vez las cantidades justas (150 ml), para que el disolvente alcance una altura de 1cm en el fondo de la cubeta. La fase móvil se dejaba en reposo al menos durante 2 horas para que la atmósfera del tanque se saturase con vapor del disolvente, lo que homogeneizaba las condiciones de cromatografía. Las aplicaciones, que contenían la mezcla de sustancias líquénicas disuelta en acetona, se hacían en una línea a 1 cm del borde inferior de la placa. Las placas se dejaban correr, a 26°C y en oscuridad, hasta 1cm del borde superior de la placa. Después se sacaba la placa y se dejaba secar al aire hasta que perdiera el olor.

Las placas se examinaban bajo luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda, 254 y 366 nm, con los ojos protegidos con gafas especiales.

- A 254 nm, las manchas se observaban como sombras oscuras sobre un fondo fluorescente. Se marcaban todas las manchas mediante un punto en el centro de cada una de ellas.
- A 366 nm se podían observar distinta fluorescencia dependiendo del tipo de sustancias, anotando el color de las mismas en la placa, así como su situación.

Después del examen físico de las placas vino el examen químico, cuando las placas se espolvoreaban con una solución de ácido sulfúrico al 10% (v/v) en agua y se calentaban en una estufa durante una hora a 100°C, hasta que el color estuviera bien

desarrollado.

Alternativamente las placas se pudieron revelar con KOH, FeCl<sub>3</sub>, etc. (véase tabla 2) con el fin de facilitar la identificación.

### 3.2.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se realizó en un cromatógrafo líquido-líquido Varian 5000. La muestra desecada se disolvió en acetonitrilo. Las medidas se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase estacionaria: Columna de fase reversa MicroPak-MCH-10, (200 mm de longitud x 4 mm de diámetro interno y 10 µm de diámetro de partícula).
- Fase móvil: [agua: ácido acético (98:2, v/v)]:[acetonitrilo] (55:45, v/v) en régimen isocrático.
- Detector UV a 280 nm.
- Flujo: 0,7 ml.min<sup>-1</sup>.
- Temperatura : 25°C.
- Presión: 80 atm.
- Unidades de absorbancia de fondo de escala: 0,002.

Los resultados del análisis se expresan en tanto por ciento de la muestra.

Como patrones se utilizaron las sustancias liquénicas aisladas, adquiridas comercialmente.

### 3.2.1.3. Espectrometría de Masas (MS)

Una de las sustancias liquénicas, aislada por TLC, fue analizada por GC-MS usando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5890, equipado con un detector cuadropolar selectivo. El análisis de datos fue realizado con una HP 5997 Chenstation. Se usó una columna capilar de 50 m HP-1 programada para subir de 250 °C a 350°C a razón de 4°C min<sup>-1</sup> y una energía de ionización por impacto electrónico de 70 eV (TÖRÖK *et al.*, 1994).

### 3.3. VISUALIZACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *EVERNIA PRUNASTRI* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE SCANNING (MEB)

Una lacinia de material vegetal fresco de *Evernia prunastri* se fracturó a mano para dejar al descubierto la sección transversal. Otra lacinia se congeló con nitrógeno líquido para que, al fracturarse, presentara una sección más nítida. Después se colocaron sobre las portas sujetándolas con Loctite y se depositó una línea de grafito para hacerla conductora. Para dar resistencia a la muestra se recubrió con oro y se observó en el microscopio de barrido.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE HOJAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA*

#### 3.4.1. Test para fenoles y taninos

Se cogió un tubo que tenía 3,0 ml del extracto hidrofólico de hojas de *Quercus rotundifolia*. Se añadieron 2 gotas de solución alcohólica de  $\text{FeCl}_3$ . Se agitó bien y se observó la variación de su color o formación de precipitado abundante, oscuro. Se comparaba con un test blanco que tenía 3,0 ml de agua destilada y 2 gotas de la solución alcohólica de  $\text{FeCl}_3$ .

- \* Coloración variable entre azul y rojo indica la presencia de fenoles; si el tubo queda blanco indica la ausencia de fenoles.
- \* Precipitado oscuro de tinta azul indica la presencia de taninos hidrolizables y verde, la presencia de taninos condensados.

#### 3.4.2. Test para antocianinas, antocianidinas y flavonoides

Se cogieron 3 tubos que tenían 2,0 ml de extracto hidrofílico cada uno, uno se llevó a pH 3, otro a pH 8,5 y el tercero a pH 11. Se observó el cambio de coloración de material según la tabla siguiente:

<i>Constituyentes</i>	<i>Acido (pH 3)</i>	<i>Alcalino (pH 8,5)</i>	<i>Alcalino (pH 11)</i>
<i>Antocianinas y antocianidinas</i>	Rojo	Lila	Azúl -Púrpura
<i>Flavonoles, flavonas y xantonas</i>	—	—	Amarillo
<i>Flavononas</i>	—	—	Rojo-Naranja

### 3.4.3. Test para alcaloides

Se cogieron 2,0 ml de extracto hidrofílico, se llevaron a pH 2 y luego se filtraron y se llevaron a un pH de 11 añadiendo el  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Posteriormente se añadió una fase de eter:cloroformo (3:1 v/v) tres veces. Se separó la fase orgánica de la fase acuosa. Se añadió  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar el exceso de agua y después se añadieron 6,0 ml de  $\text{HCl}$  0,1N. Se cogió la fase acuosa y se repartió en dos tubos, 2,0 ml en cada uno. Se añadieron en cada uno 3 gotas de reactivos de precipitación de alcaloides, "HAGER" y "MAYER", respectivamente. Se observó la formación del precipitado característico. (precipitado floculoso indica la presencia de alcaloides).

#### Preparación de reactivos

- *Reactivo de HAGER:* 6 g de ácido pícrico en 50 ml de agua destilada caliente.
- *Reactivo de MAYER:* 1,35 g cloruro mercurico en 60 ml de agua destilada + 5 g yoduro potásico en 20 ml de agua destilada. Se mezclaron los dos y se llevaron a un volumen de 100 ml.

### 3.4.4. Test para esteroides, triterpenoides y saponinas

Se añadieron 4,0 ml de cloroformo al extracto hidrofílico seco y se filtró. Se notó la formación de dos fracciones, la soluble y la insoluble. Se añadieron unos granitos de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en la fracción soluble. Luego se añadió 1,0 ml de anhídrido acético, se agitó suavemente y se añadieron 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se agitó y se anotó el color.

- ♦ Coloración azul no permanente seguida de verde permanente indicativo de la presencia de esteroides libres.
- ♦ Coloración parda a roja indicativa de la presencia de triterpenoides pentacíclicos libres.

### 3.5. VARIACIÓN DE FENOLES EN LA SAVIA XILEMÁTICA DEL FITÓFORO

Todo el material analizado en este trabajo fue recogido en El Pardo, Madrid. Se analizaron yemas, nervaduras, hojas, peciolo y ramitas primarias, secundarias y terciarias pertenecientes a ramas libres y cubiertas de líquenes, principalmente ramas que soportan sobre su corteza densas poblaciones del liquen epífito *Evernia prunastri*.

Para el estudio de la variación anual de las sustancias liquénicas en las ramitas primarias, secundarias y terciarias de *Quercus rotundifolia* Lam. pertenecientes a ramas control y ramas cubiertas del liquen, se cortaron fragmentos de aproximadamente 0,175 g de peso entre los dos extremos apical y basal de las ramas cortadas. El mismo día de su recolección, las ramas se colocaron en los tubos de centrifuga de manera que su extremo apical quedara hacia abajo y se sometieron a una centrifugación de 5000 x g, durante 15 min (modificado de AVALOS *et al.*, 1986) para extraer la savia xilemática. Los residuos fueron disueltos en acetona para análisis por TLC o en acetonitrilo para análisis por HPLC.

Para el estudio de las sustancias liquénicas en las yemas, nervaduras, peciolo y hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. pertenecientes a ramas control y ramas cubiertas del liquen, se recogieron las muestras todos los meses de ensayo, una vez en el laboratorio, se maceraron por separado en acetona para extraer sustancias liquénicas. Los extractos acetónicos se secaron en corriente de aire y los residuos secos se disolvieron o en acetona para análisis por TLC o en acetonitrilo para análisis por HPLC (modificado de LEGAZ y VICENTE, 1983).

### 3.5.1. Técnicas de cromatografía en capa fina

Los análisis por cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron en placas de cristal 20 x 20 cm usando como adsorbente el silicagel 60 G y como disolvente benceno:dioxano:ácido acético galacial (90:25:4). Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.2.1.1.

### 3.5.2. Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizaron en un cromatógrafo Varian 5000 equipado con un computador Vista 401. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.2.1.2. salvo que aquí la composición de la fase móvil era [agua:ácido acético (98:2)]:[acetonitrilo] (20:80 v/v), con una presión de 66 atm.

## 3.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LAS RAMAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA*

Las ramas utilizadas en este trabajo para esclarecer el mecanismo de progresión acrópeta de las sustancias liquénicas en la savia xilemática, han sido ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. recogidas en la misma zona y seleccionadas con criterios de homogeneidad.

Las ramas recién recogidas eran puestas a incubar en  $\text{NaHCO}_3$  1mM para el control y en medio conteniendo una concentración de  $14 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ácido úsnico disueltas en el mismo bicarbonato sódico, durante 5 días.

En dos soluciones, se añadieron, el segundo día de incubación, concentraciones de 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$  por separado.

Se cogieron, todos los días del experimento, yemas, nervaduras, peciolo y hojas procedentes de ramas control y ramas tratadas con ácido úsnico y se maceraron con

acetona para extraer fenoles. Los extractos acetónicos se secaron en corriente de aire. Se disolvieron los residuos en acetonitrilo y se analizaron por HPLC. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.5.2.

Para el estudio de la actividad de la reacción de Hill, se arrancaron, todos los días del experimento, hojas frescas. Luego se extrajeron los cloroplastos. Las condiciones de la extracción de cloroplastos son las mismas que las del apartado 3.7.1.

Para el estudio de la progresión acrópeta del ácido úsnico en el xilema de *Quercus rotundifolia*, se valoró, por HPLC, la acumulación de este compuesto fenólico en peciolo, nervaduras, hojas y yemas durante los 5 días de la incubación.

### **3.7. MEDIDA DE LA REACCIÓN DE HILL**

#### **3.7.1. Obtención de cloroplastos**

Los cloroplastos fueron aislados por maceración de hojas de encina en 40 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9. La suspensión obtenida fue filtrada a través de 5 capas de gasa y el extracto obtenido se centrifugó a 7000 x g durante 10 min a 0°C, con lo que se precipitaron los cloroplastos.

#### **3.7.2. Ensayos de la actividad fotolítica**

Los cloroplastos obtenidos a partir de 10 g de hojas de ramas control o de las incubadas con distintos tratamientos eran resuspendidos en 7 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9.

La reacción se midió como descenso de la densidad óptica a 600 nm del 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP). Los tubos de reacción contenían, en un volumen de 9,0 ml, 1,0 ml de DCPIP 0,52 mM, 1,0 ml de suspensión lamelar y 7,0 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9. En el tubo blanco la suspensión de cloroplastos activos se sustituía por tampón fosfato. El tubo control fue conservado en oscuridad mientras que

el blanco y el tubo de reacción se colocaron a 15 cm de una lámpara de 100W de intensidad, separados de ésta con un filtro de agua para evitar el calor, midiéndose la reacción cada 10 min durante 40 min.

Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de densidad óptica  $\text{min}^{-1}$  para la actividad de la reacción de Hill y en  $\text{mm}^3$  de oxígeno liberado  $\text{mg}^{-1}$  clorofila  $\text{min}^{-1}$  para la intensidad de la reacción de Hill.

Las valoraciones de la actividad de la reacción de Hill se llevaban a cabo a lo largo de 5 días, valorándose en unas ocasiones el efecto del ácido úsnico y en otras este mismo efecto en presencia de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$ .

### 3.7.3. Medida de las clorofilas

Las clorofilas se obtuvieron de cloroplastos aislados mediante extracción en acetona al 80% en oscuridad y en frío. Después, se centrifugaron a la velocidad de la sedimentación de los cloroplastos, valorando la densidad óptica del sobrenadante a 649 nm y 665 nm y calculando la concentración de clorofilas mediante la fórmula de STRAIN *et al.* (1971).

## 3.8. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS CAUSADA POR SUSTANCIAS LIQUÉNICAS

### 3.8.1. Valoración de la degradación de clorofilas por espectrofotometría

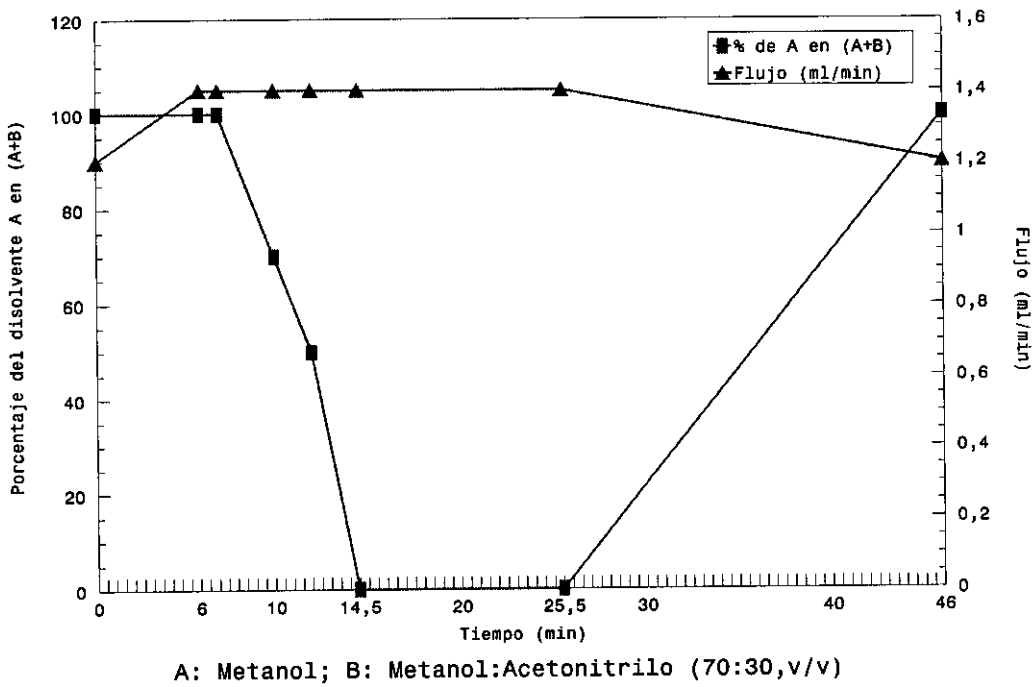
Las clorofilas *a* y *b* obtenidas mediante la extracción en acetona al 80% (véase apartado 3.7.3.) fueron incubadas con HCl 0,1N, NaOH 0,1N y atranorina, ácido úsnico, o ácido evérnico, por separado, a una concentración de  $0,23 \text{ mg.ml}^{-1}$ , durante 90 min. Se medía la concentración de clorofilas *a* y *b* cada 15 min, valorando su densidad óptica a 649 nm y 665 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en  $\mu\text{g}$  de clorofila  $\text{ml}^{-1}$ .



3.8.2. Valoración de la degradación de clorofilas por HPLC

3.8.2.1. Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la permeabilidad de los cloroplastos a las sustancias liquénicas se realizaron en un cromatógrafo Varian 5000 equipado con un computador Vista 401. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.5.2. mientras que los análisis de la degradación de clorofilas y cuantificación de productos se realizaron bajo las condiciones cromatográficas siguientes: a) fase estacionaria: columna de fase reversa Spherisorb S5 (200 mm x 4,6 mm de diámetro interno y 5µm de diámetro de partícula); fase móvil: gradiente de metanol y acetonitrilo según el esquema adjunto; T°= 25°C; λ<sup>de análisis</sup>: De tiempo 0 a tiempo 12 min = 430 nm y de tiempo 12,1 min al final = 410 nm.



### 3.8.2.2. Estudio de la penetración de fenoles en el interior del cloroplasto

Los cloroplastos utilizados en este trabajo, que eran cloroplastos activos para la fotorreducción de DCPIP (ORUS *et al.*, 1981), fueron aislados por maceración de 1,5 g de hojas de encina en un volumen suficiente de tampón fosfato 50 mM, pH 6,9. Las condiciones de extracción fueron las mismas que se han explicado el apartado 3.7.1.

100  $\mu\text{g}$  de ácido úsnico y 100  $\mu\text{g}$  de atranorina se disolvieron en 1,0 ml de acetonitrilo. Luego fueron añadidos, por separado, a una solución de 6,0 ml de NaCl al 0,2 % (p/v). Se conservó la mezcla durante un periodo de 3 días en oscuridad y a temperatura ambiente para promover la evaporación del acetonitrilo. Después se añadió 1,0 ml de la suspensión lamelar de cloroplastos a cada una de las dos mezclas y se conservaron 1 día en oscuridad a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 0°C. Se obtuvieron 2 fases: el sobrenadante y el precipitado que contenía la suspensión lamelar. Se añadieron 9,0 ml de eter etílico:acetato de etilo (65:35 v/v) en el tubo que contenía el sobrenadante y se agitó durante 2 min. Se recogió la fase orgánica y se repitió este paso una segunda vez. Al final se obtuvieron 18,0 ml de fase orgánica que se secó en corriente de aire y se analizó por HPLC, después de haber sido disuelto el residuo en 1,0 ml de acetonitrilo.

Se siguió un proceso similar con el precipitado después de romper la membrana de cloroplastos con ultrasonidos (20 Hz.s<sup>-1</sup>) en 2,0 ml de agua destilada

### 3.8.2.3. Estudio de la degradación de clorofilas y cuantificación de productos

Los pigmentos fotosintéticos fueron aislados por maceración de 1g de hojas de *Q. rotundifolia* en un volumen suficiente de acetona hasta obtener una pasta homogénea. El extracto se filtró a través una multicapa de gasa y se secó en corriente de aire.

La degradación de clorofilas *a* y *b* se observó después de su incubación con 100  $\mu\text{g}$  de ácido evérnico, 100  $\mu\text{g}$  de ácido úsnico, 100  $\mu\text{g}$  de atranorina, HCl 10<sup>-3</sup>N y NaOH 10<sup>-3</sup>N en diferentes disoluciones que contenían 1,0 mg de pigmentos fotosintéticos disueltos previamente en 60  $\mu\text{l}$  de metanol. La mezcla se conservó en

oscuridad y a temperatura ambiente y después se analizó por HPLC cada hora durante 5 horas.

### **3.9. OBSERVACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS HOJAS DE RAMAS DE *Q. ROTUNDIFOLIA* LIBRES Y CUBIERTAS DE LÍQUENES EPÍFITOS**

#### **3.9.1. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) para el estudio del efecto de las sustancias líquénicas sobre los cloroplastos**

##### **3.9.1.1. Cortes ultrafinos**

##### **3.9.1.1.1. Fijación**

En este estudio se han cogido hojas procedentes de ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. que estuvieron muy pobladas de líquenes epífitos, en especial de *Evernia prunastri* (L.) Ach. Como hojas control, se han tomado aquellas pertenecientes a ramas libres de epífitos. La época de la recogida de muestras ha sido en marzo.

Las hojas fueron prefijadas con glutaraldehído. Para ello se seccionó la zona central de las hojas maduras en trozos de 1 mm poco más o menos. Inmediatamente fueron prefijadas con glutaraldehído al 3,25% en tampón Sorensen 0,1M pH 7,3. El glutaraldehído se prepara en el momento de su uso a partir de una solución comercial al 25% de la firma FLUKA. Se mantuvieron 3 horas en esta solución fijadora de glutaraldehído, a 4°C. A continuación se lavaron dos o tres veces con el tampón donde permanecieron toda la noche en nevera. Al día siguiente se postfijaron con tetróxido de osmio, OsO<sub>4</sub>, al 1% en el tampón, durante 2 horas y a temperatura ambiente.

Se debe preparar una solución de ácido ósmico al 2% como mínimo 48 h antes de su empleo a partir de una ampolla de tetróxido de osmio (SERVA) a la cual hay que quitar perfectamente la etiqueta, pasar por agua caliente y a continuación por agua fría para que se formen pequeños cristales del ácido en las paredes de la ampolla. Se rompe la ampolla en el interior de un frasco conteniendo agua destilada en cantidad necesaria para obtener la concentración citada. En el momento de su uso, esta solución, que está al

2%, se diluye en tampón Sorensen 0,1M pH 7,3 a partes iguales para conseguir una disolución al 1% de tetróxido de osmio que se emplea en la postfijación.

3.9.1.1.2. Deshidratación

Las muestras doblemente fijadas se deshidrataron mediante soluciones de etanol progresivamente más concentradas hasta llegar al 100% donde permanecieron 3 horas:

<i>etanol al 30 %</i> .....	<i>15 min</i>
<i>etanol al 50 %</i> .....	<i>15 min</i>
<i>etanol al 70 %</i> .....	<i>15 min</i>
<i>etanol al 90 %</i> .....	<i>30 min</i>
<i>etanol al 90 %</i> .....	<i>30 min</i>
<i>etanol al 100 %</i> .....	<i>1 hora</i>
<i>etanol al 100 %</i> .....	<i>1 hora</i>
<i>etanol al 100 %</i> .....	<i>1 hora</i>

3.9.1.1.3. Inclusión

Después de dos lavados de 20 min con óxido de propileno, se incluyen las muestras en medio Spurr (SPURR, 1969). Esta resina lleva los siguientes componentes:

<i>VCD (resina)</i> .....	<i>10g</i>
<i>DER 736 (flexibilizador)</i> .....	<i>6g</i>
<i>NSA (endurecedor)</i> .....	<i>26g</i>
<i>Dimetilaminol (acelerador)</i> .....	<i>0,2g</i>

Finalmente se mantuvieron las muestras en Spurr puro a 4°C durante una noche, habiéndose renovado el Spurr una vez. A continuación se colocaron en moldes silicona y rellenado de Spurr.

La polimerización de la resina de los moldes, en cuyo fondo están incluidas las muestras, se realizó a 70°C durante 24 horas.

#### 3.9.1.1.4. Ultramicrotomía

Los cortes ultrafinos (600-700 Å) de las muestras incluidas en Spurr se obtuvieron con un ultramicrotomo REICHERT-JUNG ULTRACUT E, empleándose una cuchilla de diamante DUPONT. Los cortes así conseguidos quedan flotando sobre una superficie de agua destilada y su grosor se observa por reflexión de luz. De la superficie del agua se recogen por contacto con rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y 200 mallas.

#### 3.9.1.1.5. Tinción

Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo (REYNOLDS, 1963), durante 8 min y fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión PHILIPS 300.

### 3.9.2. Toma de fotografías

Los cortes ultrafinos obtenidos de las inclusiones del tratamiento de hojas han sido analizados con el microscopio electrónico. Para el estudio del efecto de las sustancias liquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach. sobre la organización de tilacoides, el tamaño y la ultraestructura de los cloroplastos de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam., se han tomado varias fotografías sobre estos cortes.

#### 3.9.2.1. Análisis de Imagen

El estudio morfométrico de las hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. procedentes de ramas cubiertas de liquen *Evernia prunastri* (L.) Ach. y ramas control se ha llevado acabo con un analizador de imagen semiautomático, MOP VIDEOPLAN, de la marca KOHTRON.

### 3.10. CONDICIONES DE TRATAMIENTO DE LAS YEMAS DE *Q. ROTUNDIFOLIA* CON AUXINA EXÓGENA

Las yemas apicales de ramas de *Q. rotundifolia* Lam. muy pobladas de líquenes epífitos, principalmente por *Evernia prunastri*, fueron tratadas con auxina exógena al  $10^{-4}$  M desde enero hasta abril del 96, y otras muestras han sido tratadas, en las mismas condiciones, desde abril hasta julio del 97. Las muestras tratadas han sido recogidas en julio del 97 y agosto del 97, respectivamente. La auxina libre y la conjugada han sido extraídas de estas muestras y analizadas por HPLC. Como yemas control, han sido aquellas pertenecientes a ramas pobladas de líquenes epífitos pero sin tratamiento con auxina exógena.

### 3.11. ANÁLISIS Y VALORACIÓN DE AUXINAS EN YEMAS CON Y SIN TRATAMIENTO CON AUXINAS EXÓGENAS

#### 3.11.1. Extracción de auxina

Yemas apicales y ramitas de *Q. rotundifolia* Lam. pobladas por *Evernia prunastri* (L.) Ach. han sido recogidas en El Pardo de Madrid, y transportadas al laboratorio para su análisis. Como control han sido usadas yemas apicales y ramitas procedentes de ramas de *Quercus rotundifolia* Lam sin líquenes epífitos.

Se maceraron las yemas apicales y las ramitas por separado en metanol al 70% que contenía  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de hidroxitolueno butilado y se mantuvo el homogeneizado agitándose una noche en oscuridad a  $6^{\circ}\text{C}$ . Después la mezcla se centrifugó a  $5000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tiró el precipitado y el sobrenadante, que tenía la auxina, se secó en corriente de aire a  $50^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa se dividió en dos partes, una para analizar auxina libre, la otra para auxina conjugada. La primera se ajustó a un pH 2,5 con ácido clorhídrico y después se añadieron 2 volúmenes de éter etílico. Se agitó la mezcla durante 1 min y se formaron 2 fases: una de ellas, la de éter etílico, contenía la auxina. Esta fase orgánica se secó en corriente de aire y se disolvieron los residuos en 1,0 ml de éter etílico para análisis por TLC o, alternativamente, en 0,5 ml de acetonitrilo para análisis por HPLC.

La segunda parte, que se usó para determinar la auxina conjugada, se ajustó a un pH alcalino (pH 8,5) con sosa y se guardó a 100°C durante 3 horas para hidrolizar los conjugados (BANDURSKI y SCHULZE, 1977). Después de esto, el pH fue reducido a 2,5 con ácido clorhídrico y se siguieron los mismos pasos que con la auxina libre.

La cuantificación de la auxina conjugada se hizo restando la cantidad de la auxina libre antes de la hidrólisis de la cantidad de la auxina libre después de la hidrólisis alcalina.

### **3.11.2. Técnicas de cromatografía en capa fina (TLC)**

Para la identificación de la auxina por cromatografía en capa fina, las muestras, recuperadas de la etapa de extracción de auxina, fueron depositadas sobre placas de silicagel 60 G, usando cloroformo:acetato de etilo:ácido acético glacial (5:4:1) como disolvente (RAMAUT, 1963). Se detectó la auxina por emisión de fluorescencia después de examinar las placas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm y se identificó usando un patrón de referencia.

### **3.11.3. Purificación de la auxina**

Se recuperaron del cromatograma las manchas con el mismo  $R_f$  que el del patrón de auxina, rascando y eluyéndolas del polvo con acetonitrilo. Se conservaron una noche en oscuridad y el día siguiente se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min a 5°C. Se recogieron los residuos después por desecación del sobrenadante.

### **3.11.4. Técnicas de espectrofotometría**

Se disolvieron las muestras anteriormente preparadas en 3,0 ml de metanol cada una. Se hicieron espectros de absorción de las muestras analizadas. Como patrón se usó la auxina  $10^{-4}$ M en metanol y como blanco metanol puro.

### 3.11.5. Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la valoración de la auxina por cromatografía líquida de alta resolución, las muestras recuperadas de TLC se disolvieron en acetonitrilo y después se analizaron por HPLC. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.5.2.

### 3.12. ANÁLISIS DEL CONJUGADO AUXINA-SUSTANCIA LIQUÉNICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La conjugación *in vitro* ha sido observada después de incubar la auxina  $10^{-4}M$  con  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  de ácido úsnico en condiciones diferentes de luz, temperatura y pH. El conjugado ha sido detectado por HPLC. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.5.2.

### 3.13. ANÁLISIS DE LA INCUBACIÓN DE LA AUXINA CON PEROXIDASA CON Y SIN PRESENCIA DE ÁCIDO ÚSNICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La incubación de la auxina  $2 \cdot 10^{-4}M$  con la peroxidasa,  $0,23 \text{ mg ml}^{-1}$ , con o sin el ácido úsnico,  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ , se hizo en 6 tubos de ensayo numerados de 1 a 6 y poniendo en cada uno de ellos  $2,0 \text{ ml}$  de extracto de ramas de *Q. rotundifolia* con la concentración de  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$  macerados en tampón fosfato  $50 \text{ mM}$ , pH 6,9. Los tubos de reacción fueron repartidos de la manera siguiente:

	Extracto vegetal	Auxina $2 \cdot 10^{-4}M$	Peroxidasa $0,23 \text{ mg.ml}^{-1}$	Acido úsnico $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$	$H_2O_2$ (3%)	T. fosfato $50\text{mM}$ pH 6,9	Volumen final
1	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	---	$0,5 \text{ ml}$	$1,5 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$
2	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	$0,1 \text{ ml}$	$0,5 \text{ ml}$	$1,4 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$
3	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	---	---	$0,5 \text{ ml}$	$3,5 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$
4	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	---	$0,1 \text{ ml}$	$0,5 \text{ ml}$	$3,4 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$
5	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	---	---	---	$4,0 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$
6	$2,0 \text{ ml}$	$2,0 \text{ ml}$	---	$0,1 \text{ ml}$	---	$3,9 \text{ ml}$	$8,0 \text{ ml}$



El tiempo de reacción fue de un día, tras el cual se paró la reacción por congelación de los tubos. Se secaron las muestras por liofilización. Los residuos se disolvieron en 3,0 ml de acetonitrilo y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 0°C. Se recogió el sobrenadante y se analizó por HPLC. Se añadieron 2,0 ml de acetonitrilo al precipitado, se agitó durante 1 min y se dejó reposar hasta que se formaron 2 fases. La fase orgánica de acetonitrilo se recogió y se analizó por HPLC.

El pico de degradación de la auxina por peroxidasa ha sido detectado por HPLC. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.5.2.

El ácido úsnico, la auxina y la peroxidasa usados en este experimento, se adquirieron de la firma comercial SIGMA.

### **3.14. OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *PARMELIA HYPOLEUCINA* (J.) STEIN**

Las sustancias liquénicas han sido extraídas de talos de *Parmelia hypoleucina* (J.) Stein. Estos talos han sido recogidos de troncos y ramas de *Quercus suber* en la zona de Canal Zouada, provincia de Larache (Marruecos), y después transportados al laboratorio para análisis. Las condiciones de extracción de las sustancias liquénicas de *Parmelia hypoleucina* (J.) Stein son las mismas que se han explicado en el apartado 3.2.

#### **3.14.1. Análisis del extracto acetónico**

##### **3.14.1.1. Técnicas de cromatografía en capa fina**

Las condiciones de cromatografía en capa fina son las mismas que se han explicado en el apartado 3.2.1.1. salvo aquí se utilizó la fase móvil tolueno:dioxano:ácido acético (180:60:5 v/v) (CULBERSON y KRISTINSSON, 1972; CULBERSON, 1972, 1974; CULBERSON y JOHNSON, 1982).

### 3.14.1.2. Técnicas de cromatografía bidimensional

Esta técnica consistió en desarrollar la placa en dos sentidos perpendiculares entre sí con dos disolventes distintos, de tal forma que en el primer desarrollo las sustancias se repartieron a lo largo de la línea base para el segundo desarrollo (CULBERSON y JOHNSON, 1976, 1981).

Esta técnica nos sirvió también para identificar sustancias desconocidas en la muestra por aplicación simultánea de patrones conocidos con la muestra problema.

Se utilizaron placas de 20x20 cm. Se trazaron dos líneas base a 2 cm respectivamente de dos lados perpendiculares entre sí, y luego dos líneas frente, paralelas a sus respectivas líneas base, a 10 cm de las mismas. La muestra problema se aplicó en el punto de cruce de las dos líneas base.

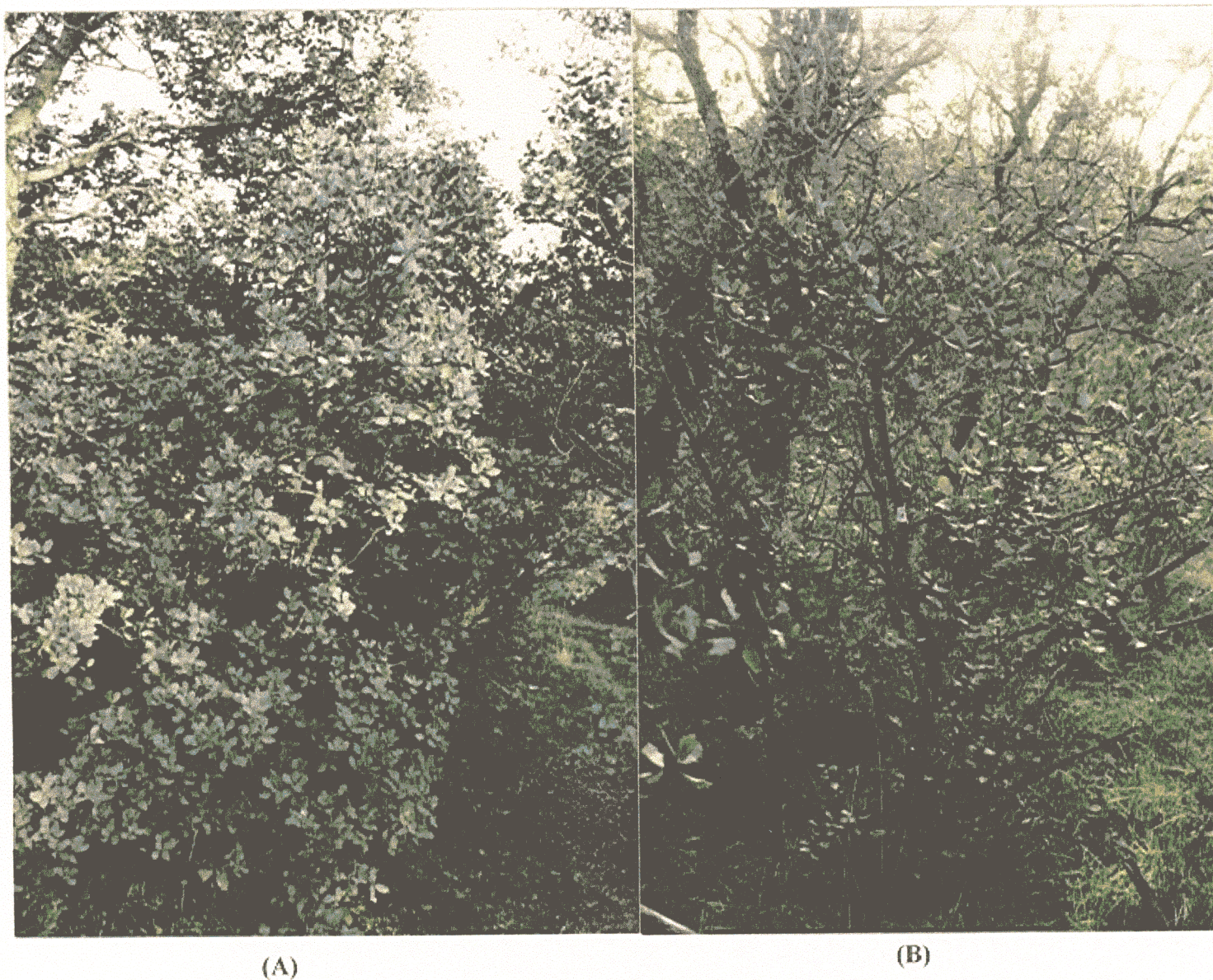
Las dos fases móviles usadas en esta técnica han sido, benceno:dioxano:ácido acético glacial (90:25:4 v/v) (RAMAUT, 1963) como primer disolvente y dioxano:ácido acético (25:15 v/v) como segundo disolvente. Las placas se examinaban bajo luz ultravioleta a 366 nm y con el desarrollo de colores después de espolvorearlas con una solución de ácido sulfúrico al 10% (v/v) en agua y calentarlas 1 hora a 100°C.

### 3.14.1.3. Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizaron en un cromatógrafo Varian 5000 equipado con un computadora Vista 401. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se han explicado en el apartado 3.2.1.2. salvo aquí la presión era de 92 atm.



## *4. RESULTADOS*



**Fig. 4:** *Quercus rotundifolia* Lam. sin (A) y con una densa (B) población líquénica, principalmente de *Evernia prunastri* (L.) Ach.

#### 4.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH.

##### 4.1.1. Cromatografía en capa fina (TLC o CCF)

Por cromatografía en capa fina se han identificado todas las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach. que desarrollan colores típicos al reaccionar con ácido sulfúrico al 10%. Los  $R_f$  de tales sustancias dependen de muchas condiciones, tales como la proporción de la fase móvil y el tipo del gel empleado como fase estacionaria (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra los reactivos y colorantes usados para la detección de las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach., en la que se especifican los colores desarrollados por tales sustancias.

Durante la separación por cromatografía en capa fina se ha detectado una sustancia líquénica cuyo  $R_f$  es de 0,19 y que absorbe en las mismas longitudes de onda que las demás sustancias líquénicas. También reacciona con los reactivos químicos capaces de desarrollar color (Tabla 3). Este descubrimiento nos llevó a purificarla para poder estudiarla con técnicas de gran sensibilidad y eficacia como la espectrometría de masas, que nos aseguró que no se trataba de un fenol conocido al comparar su masa molecular con las de las demás sustancias líquénicas descritas para esta especie.

##### 4.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Por cromatografía líquida de alta resolución se ha podido cuantificar la proporción de cada una de las sustancias líquénicas presentes en el talo de *Evernia prunastri* (L.) Ach. (Fig. 5) y el tiempo de retención de cada una de esas sustancias (Tabla 4).



	<i>Silicagel 60G</i>	<i>Silicagel 60HF<sub>254-366</sub></i>
<i>Atranorina</i>	0,92	0,96
<i>Acido úsnico</i>	0,88	0,92
<i>Acido evérnico</i>	0,77	0,76
<i>Sustancia líquénica X</i>	0,19	0,32

Tabla 2: Valores de  $R_f$  de las sustancias líquénicas extraídas de *Evernia prunastri* (L.) Ach., por lavado acetónico, y separadas por TLC usando dos tipos de silicagel.

	<i>Tiempo de retención (min)</i>
<i>Acido evérnico</i>	7,98
<i>Acido úsnico</i>	17,49
<i>Atranorina</i>	20,08
<i>Cloroatranorina</i>	24,83
<i>No identificadas</i>	—

Tabla 4: Tiempo de retención de cada una de las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach. tras su separación por HPLC

Sustancias Líquénicas ►	Acido úsnico	Acido evérnico	Atranorina	Sustancia líquénica X
Reactivos ▼				
Acido sulfúrico	Amarillo	Gris	Amarillo	Azul
Cloruro férrico	Azul-violeta	Azul-violeta	Azul-violeta	Azul-violeta
Bencidina	Amarillo	Azul-violeta	Amarillo	Amarillo
Anilina	Rojo-vino	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Clohidrato de anilina	Amarillo	----	Naranja	Azul
p-Fenilendiamina	Amarillo	Amarillo	Naranja	----
N,N-dimetil-p-fenilendiamina	Amarillo	----	Amarillo	Amarillo
Hidróxido potásico	Amarillo	Naranja	Naranja	----
Hipoclorito cálcico	Amarillo	Naranja	Naranja	Amarillo
KOH+Ca(OCl) <sub>2</sub>	Amarillo	----	Naranja	Amarillo
Cloruro cálcico	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Fosfato tricálcico	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Carbonato cálcico	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Sulfato cálcico	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo

Tabla 3: Reactivos usados para la detección de las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach. por TLC.

#### 4.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Por microscopía electrónica de barrido se han podido observar las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach. bajo forma de cristales depositados sobre las hifas del liquen.

Las figuras 6 y 7 corresponden al material fracturado tras la congelación en nitrógeno líquido, mientras que las figuras 8 y 9 corresponden al material fracturado a mano.

#### 4.1.4. Espectrometría de masas

La sustancia con  $R_f$  0,19 sobre silicagel 60 G fue eluida de la placa con acetona, secada y acumulada hasta obtener peso suficiente para su análisis por espectrometría de masas. La señal  $m/z$  662 (Fig. 10) sólo puede interpretarse como correspondiente a la existencia de un dímero del ácido evérnico (331+331), según se especifica en la figura 11. Hasta ahora sólo se había descrito la existencia de un dímero del ácido solorínico en *Solorina crocea* (STEGLICH y JEDTKE, 1976). La labilidad de los grupos metoxilo al impacto electrónico justifica la aparición de fragmentos de  $m/z$  647 y 515 (Fig. 12). La ruptura del anillo B podría dar lugar a la formación de fragmentos  $m/z$  532 (531, 278 y 219), mientras que la separación completa del anillo B daría lugar a la formación del fragmento  $m/z$  446, con un carboxilo aniónico en lugar de la función carbonilo propuesta por HUNECK y YOSHIMURA (1996) como típico de la ruptura de depsidos. Sí, en cambio, se forman fragmentos semiquinónicos de  $m/z$  532, 514 y 446 (Fig. 12), de acuerdo con los citados autores.

#### 4.2. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE HOJAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA* LAM.

El extracto hidrofílico de las hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. reaccionó con  $FeCl_3$  dando un color azul-negro y un precipitado verde característicos de la presencia de fenoles y taninos, respectivamente.

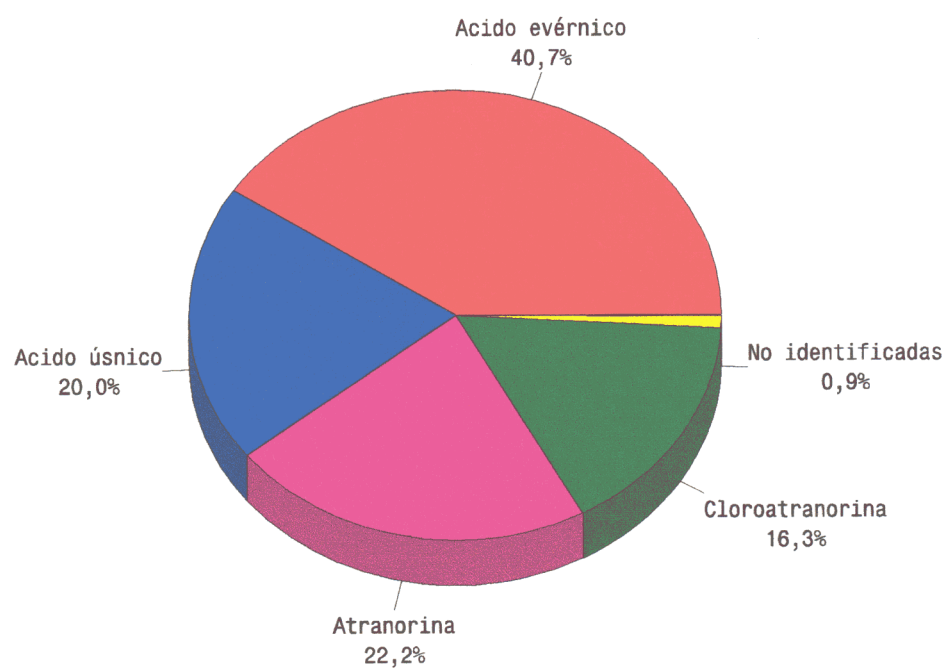


La presencia de flavonoides en hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. fue confirmada por el cambio de color del extracto hidrofílico cuando se llevó a un pH 11. Después de añadir 2 gotas de NaCl en el mismo tubo y calentarlo, se confirmó el cambio de color, lo que indica la presencia de flavononas.

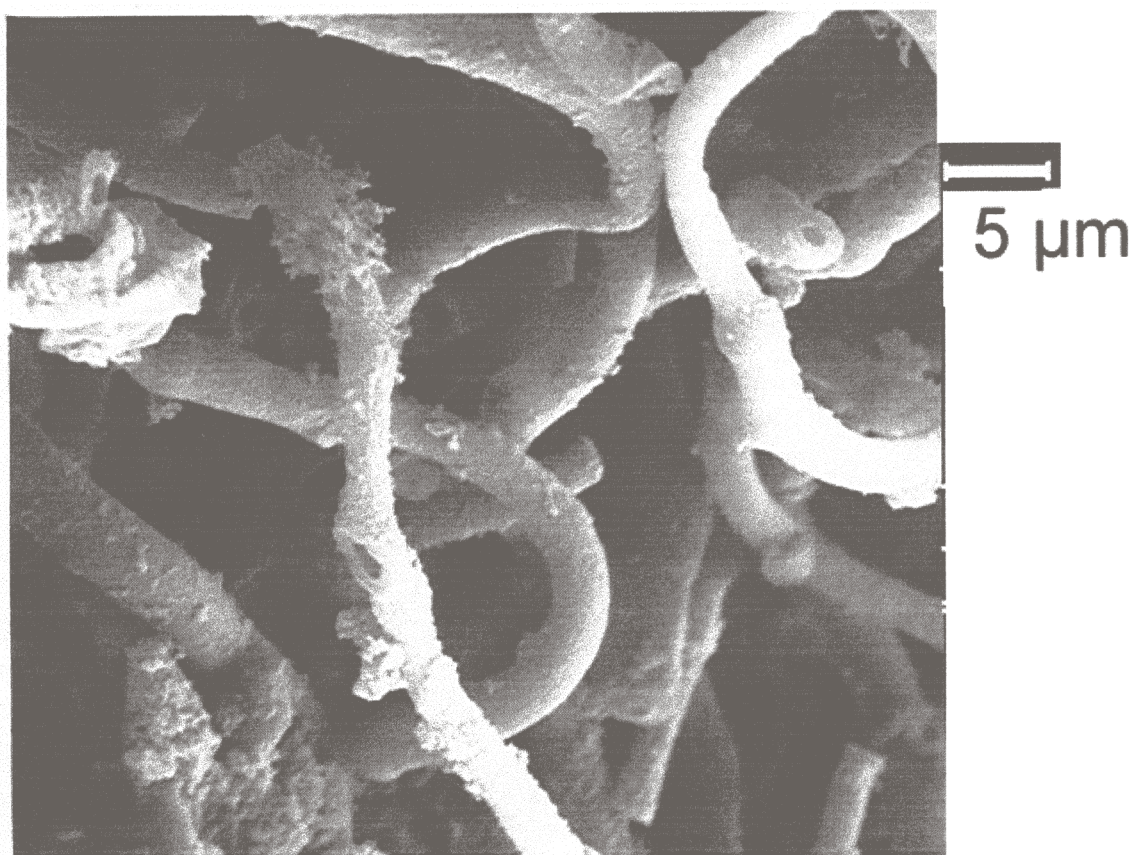
La presencia de alcaloides en las hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. fue confirmada por el precipitado floculoso observado después de añadir el reactivo de HAGER al extracto hidrofílico.

La presencia de esteroides libres fue confirmada por el color verde-azul desarrollado por la parte soluble del extracto hidrofílico después de reaccionar con el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , anhídrido acético y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Los resultados completos de la caracterización fitoquímica de las hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. están representados en la tabla 5.

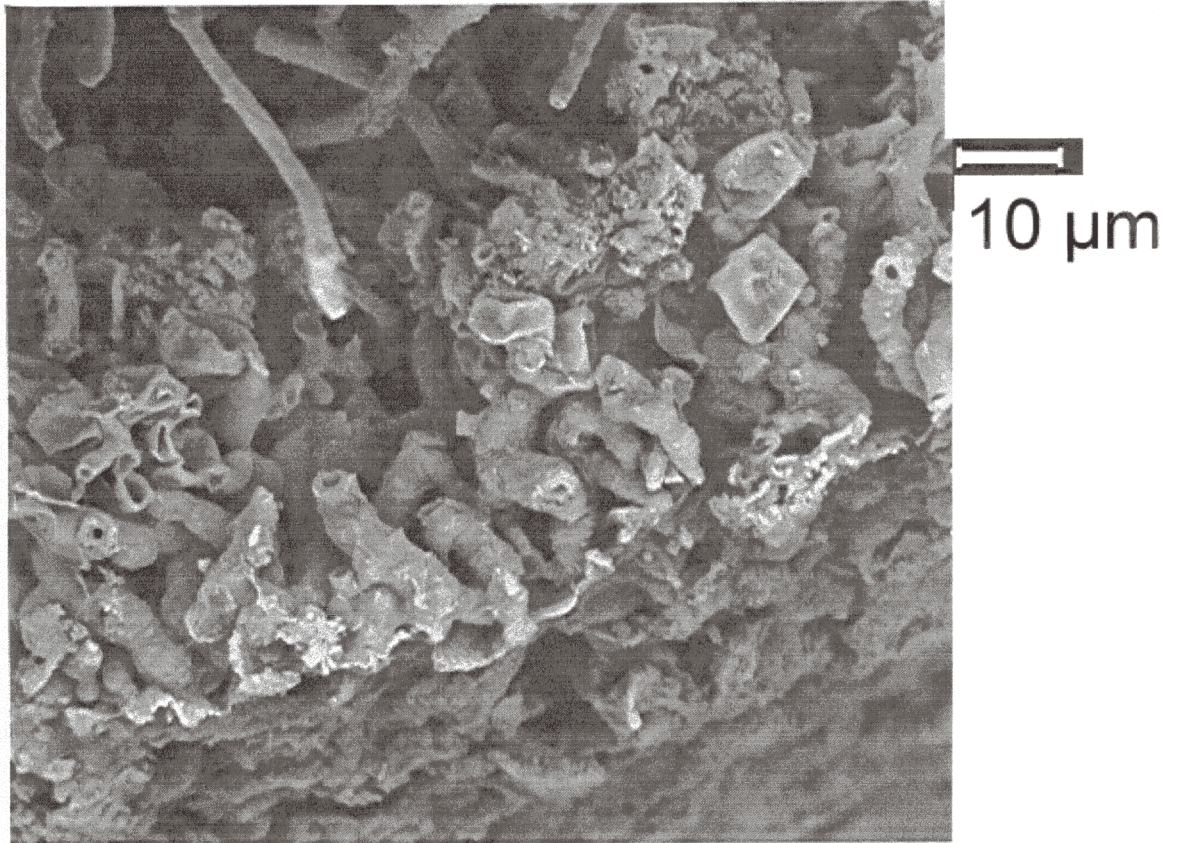


**Fig. 5:** Proporción de las sustancias liquénicas en el talo de *Evernia prunastri* (L.) Ach.



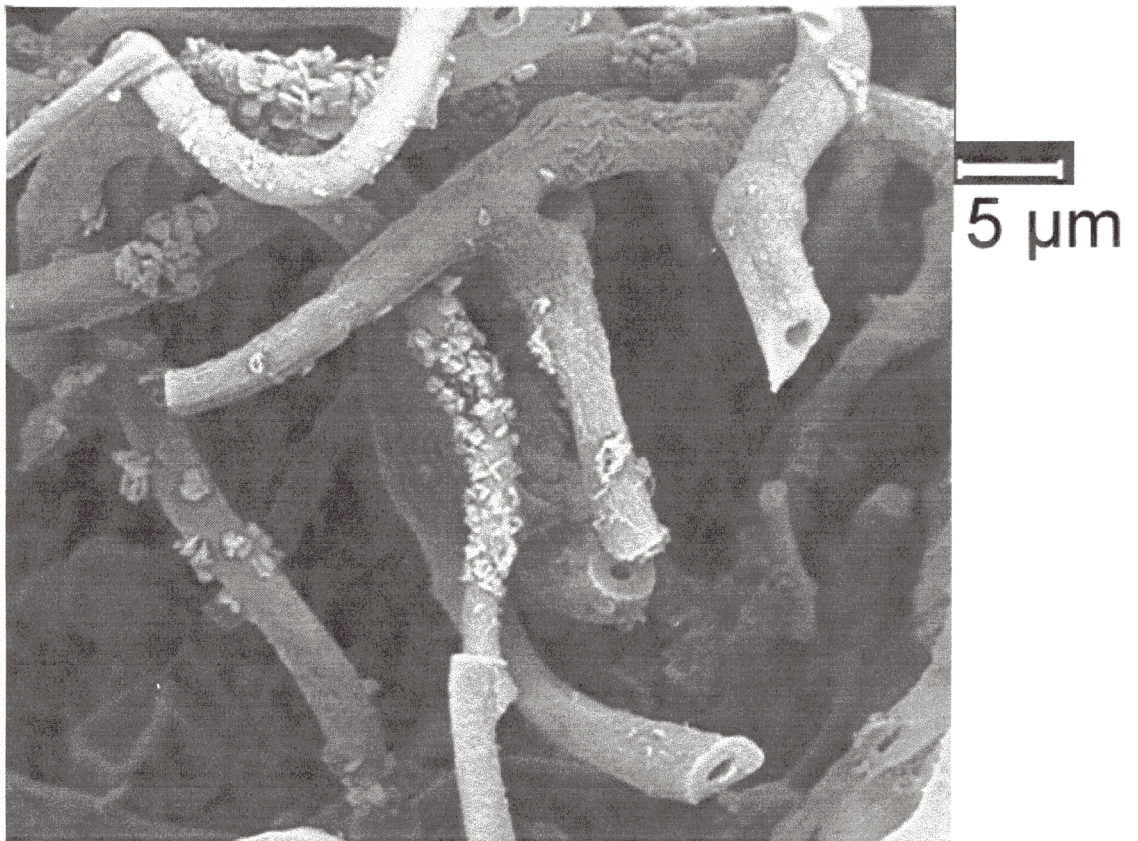
**Fig. 6:** *Evernia prunastri* (L.) Ach. x2000.

Detalle de las sustancias líquénicas de la médula próximas al córtex superior.



**Fig. 7:** *Evernia prunastri* (L.) Ach. x1000.  
Detalle del córtex superior.





**Fig. 8:** *Evernia prunastri* (L.) Ach. x2000.

Detalle de las sustancias liquénicas de la médula cercana al córtex inferior.



**Fig. 9:** *Evernia prunastri* (L.) Ach. x3000.  
Detalle de la médula.

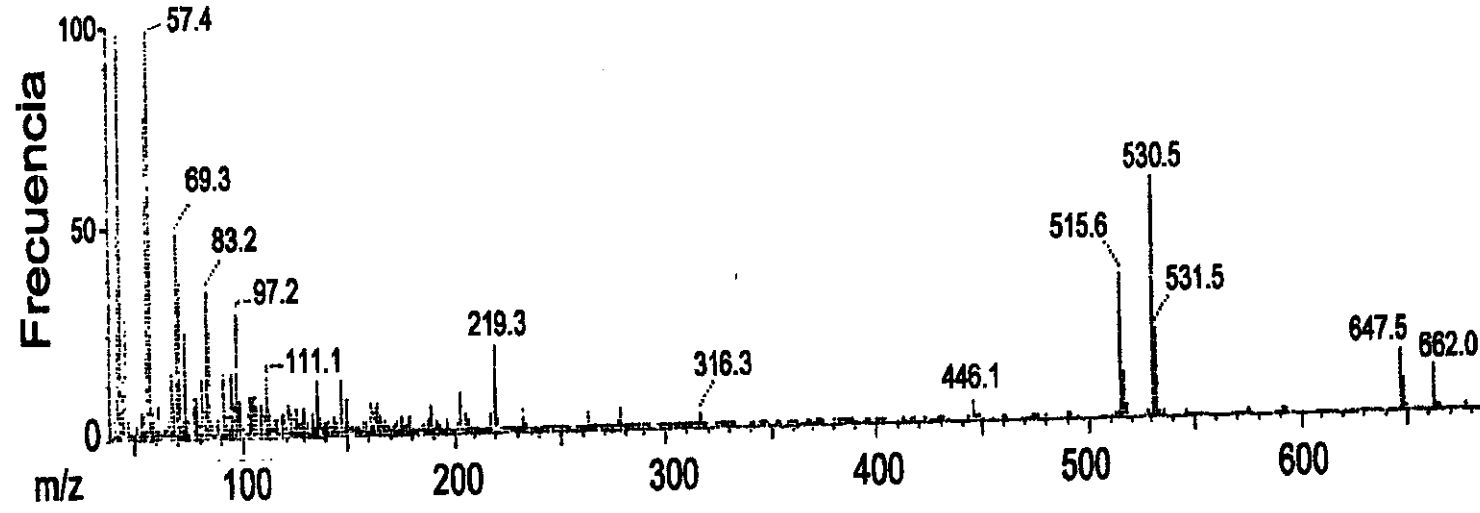
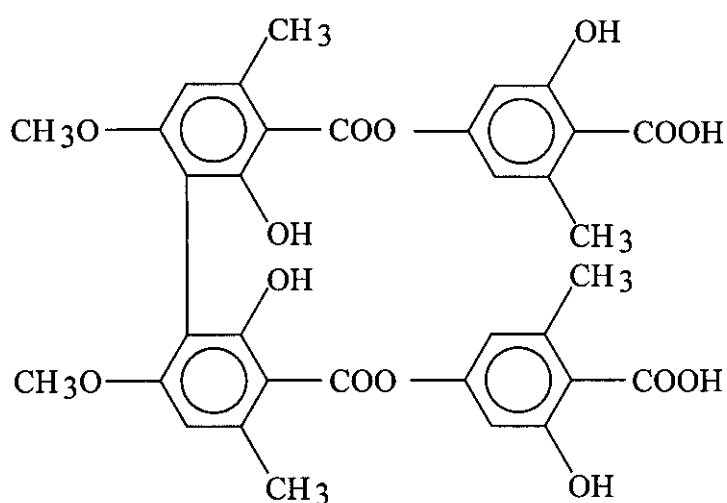
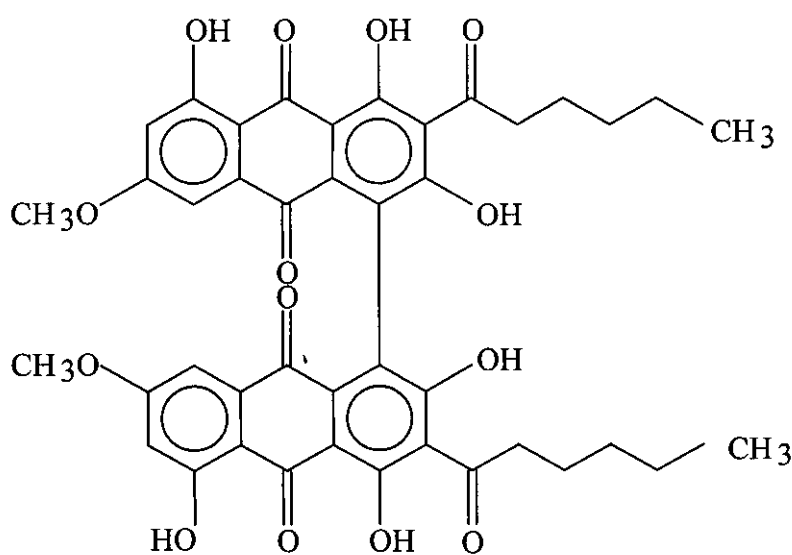


Fig. 10: Espectro de masas de la sustancia de  $R_f$  0.19 en silicagel 60 G



Acido 3,3-dievérnico

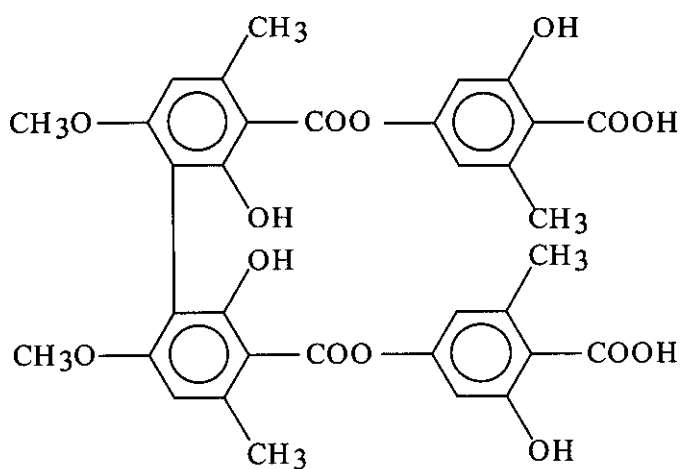


Acido 4,4'-disolorínico

(aislado de *Solorina crocea* por Steglich y Jedtke, 1976)**Fig. 11:** Estructura química propuesta para el dímero del ácido evérnico y estructura química del ácido disolorínico.

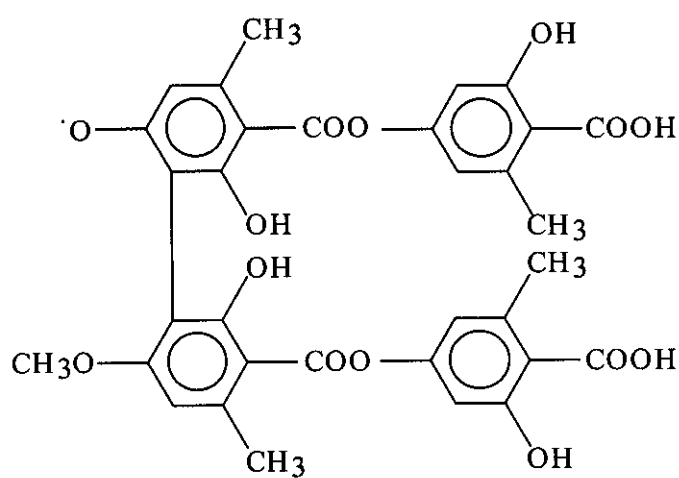


**Fig. 12:** Estructuras químicas propuestas como interpretación de las señales  $m/z$  de los diferentes fragmentos del dímero del ácido evérnico obtenidos por espectrometría de masas

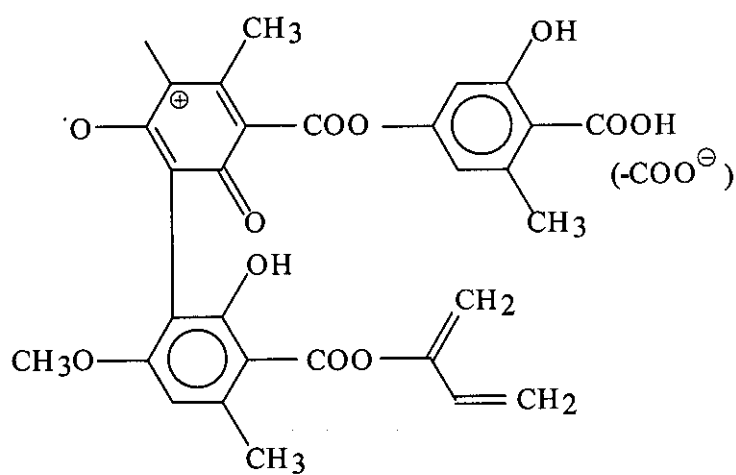


m/ z 662

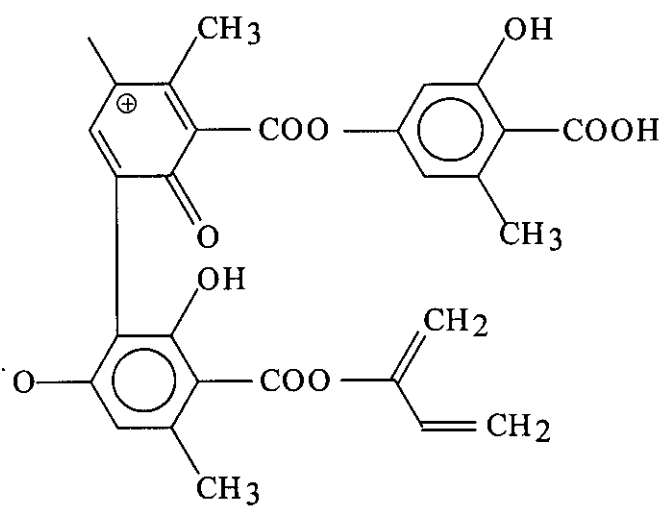
Acido 3,3-dievérnico



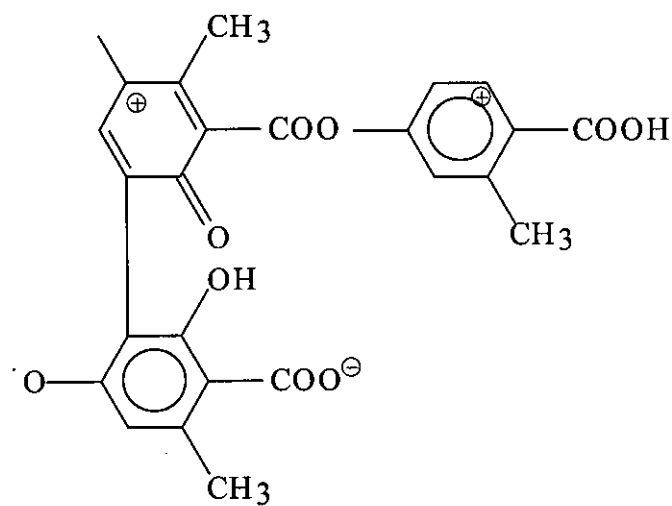
m/ z 647



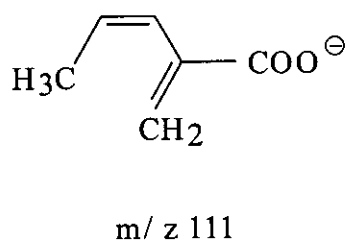
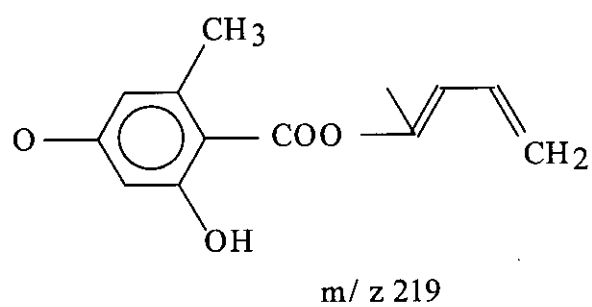
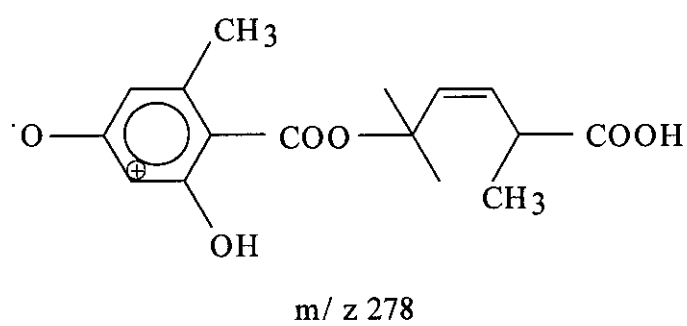
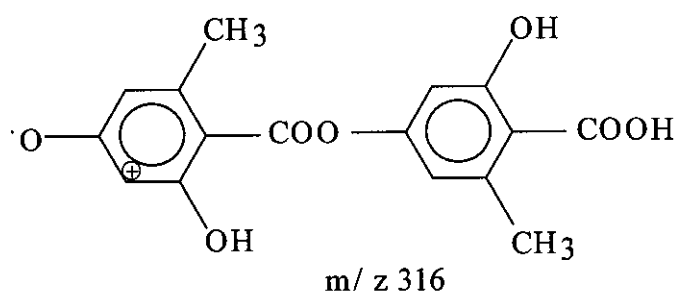
m/ z 532 (531)



m/ z 515



m/ z 446



#### 4.3. VARIACIÓN ANUAL DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH. EN EL XILEMA DE RAMAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA* LAM.

El análisis por cromatografía en capa fina del contenido xilemático de ramas de *Quercus rotundifolia* (L.) Ach. con cobertura liquénica, indicó la existencia de la principal sustancia liquénica de *Evernia prunastri* (L.) Ach., ácido evérnico, que desarrolló un color gris con ácido sulfúrico al 10% después de calentar las placas de TLC una hora a 100°C. El valor de su  $R_f$  fue de 0,71, el mismo que el del ácido evérnico patrón (Fig. 13).

El análisis mensual por cromatografía líquida de alta resolución, de enero hasta septiembre, confirmó la existencia de los ácidos evérnico y úsnico, de origen liquénico, en el xilema de las ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. con una densa cobertura del liquen epífito *Evernia prunastri* (L.) Ach. La concentración de esas sustancias liquénicas ha sido siempre más alta en ramas primarias que en secundarias o terciarias (Figs. 14 y 15). El ácido evérnico ha sido detectado en la savia xilemática de ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. todos los meses ensayados (Fig. 14); sin embargo el ácido úsnico fue acumulado a partir de febrero (Fig. 15).

En peciolos, el ácido evérnico ha sido la única sustancia liquénica detectada (28,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco), pero sólo en marzo.

En yemas, el ácido evérnico ha sido detectado en aquellas procedentes de ramas secundarias en abril (31,4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco) y en yemas procedentes de ramas primarias en mayo (14,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco), pero el ácido úsnico ha sido detectado sólo en junio (Tabla 6). Sin embargo, no se ha detectado ninguno de los dos ácidos, evérnico y úsnico, en extractos de hojas y nervadura media durante los meses ensayados.

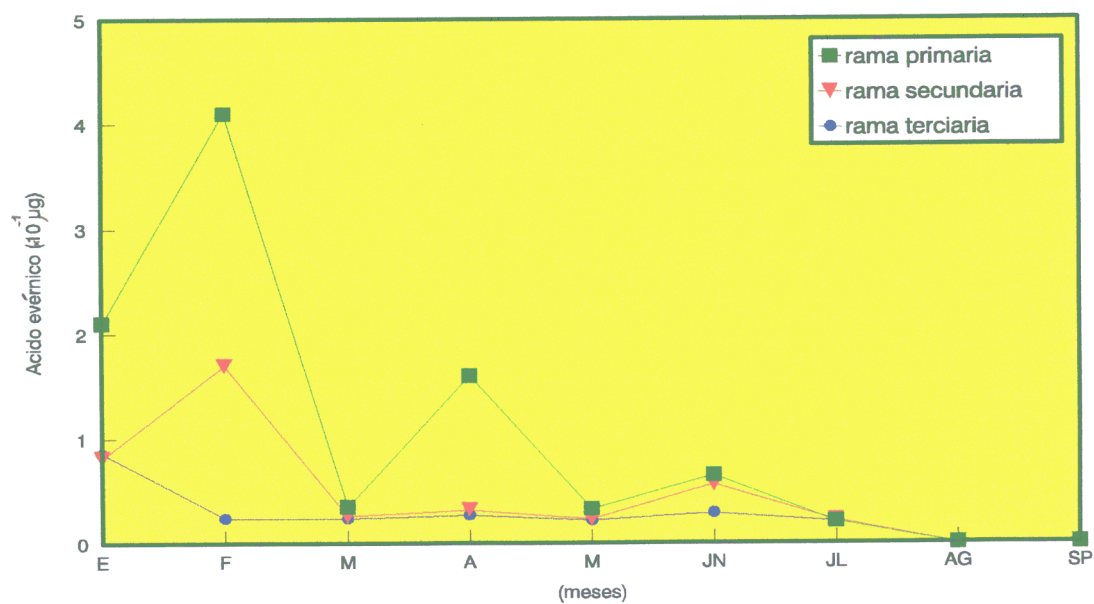
Fenol	+++
Taninos	+++
Flavonoides	+++
Antocianinas y Antocianidinas	0
Flavonoles, Flavonas y Xantonas.	0
Chalconas y Auronas	0
Leucoantocianidinas	0
Catequinas	0
Flavononas	+++
Alcaloides	+++
Esteroides	+
Triterpenos	0
Saponinas	0

Tabla 5: Compuestos químicos del extracto hidrofílico de hojas de  
*Quercus rotundifolia* Lam.



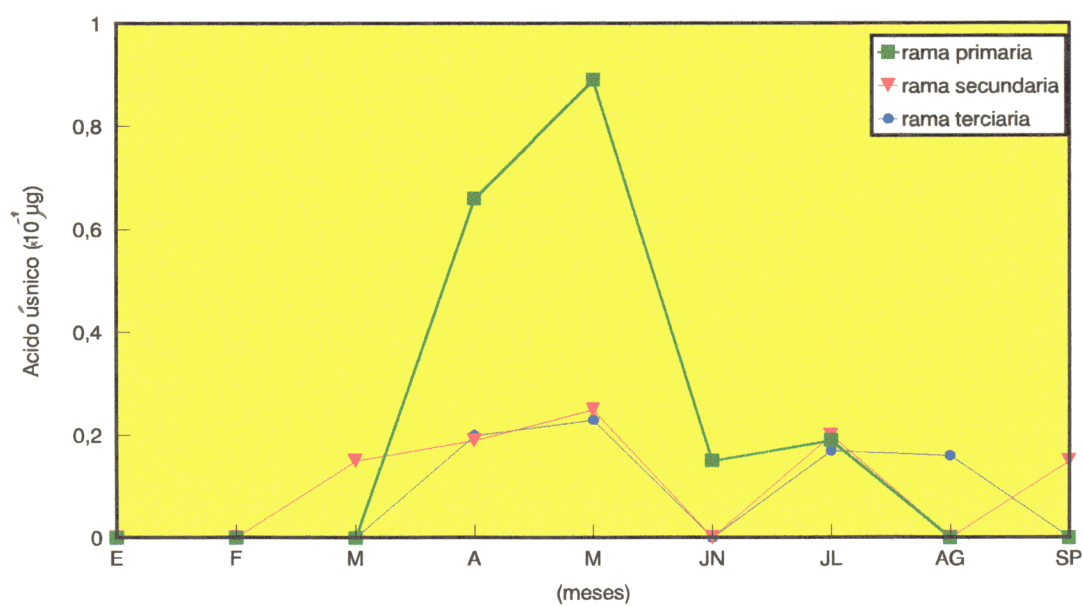
**Fig. 13:** *Quercus rotundifolia* (L.) Lam.

Análisis por TLC del xilema de ramas con una densa población del líquen epifito  
*Evernia prunastri* (L.) Ach.



**Fig. 14:** Variación mensual del ácido evénico en ramas primarias, secundarias y terciarias de *Quercus rotundifolia* con líquenes epífitos, desde enero hasta septiembre de 1996.





**Fig. 15:** Variación mensual del ácido úsnico en ramas primarias, secundarias y terciarias de *Quercus rotundifolia* con líquenes epífitos, desde enero hasta septiembre de 1996.

#### 4.4. APLICACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS EXÓGENAS A CORTES DE RAMAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA* LAM.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución de muestras procedentes de las incubaciones de ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. 5 días en disoluciones de ácido úsnico demostraron la acumulación de esta sustancia liquénica desde el primer día en los peciolos y las yemas, mientras que este fenol fue detectado en las nervaduras el segundo día. Sin embargo, en las hojas no se ha detectado ácido úsnico en ninguno de los 5 días de incubación (Tabla 7).

El ácido úsnico ha sido preferente acumulado en cantidades relativamente altas en las yemas y nervaduras.

#### 4.5. PENETRACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS EN LOS CLOROPLASTOS

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución del sobrenadante y del precipitado obtenidos después de la incubación de cloroplastos con el ácido úsnico y atranorina confirmó que era más difícil para los ácidos úsnico y evérnico que para la atranorina atravesar la membrana cloroplástica (Fig. 16).

Después de un día de incubación de cloroplastos con el correspondiente fenol, la cantidad de atranorina recuperada del precipitado ha sido casi de 3,5 veces más alta que la del ácido úsnico (Fig. 16). En ambos casos, el fenol desaparece del medio de incubación a una velocidad más alta de la que se ligaba a las estructuras del cloroplasto. El análisis por espectrofotometría de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. indicó que la mezcla de clorofilas tiene dos máximos de absorbancia, el principal en 430 nm y el secundario en 665 nm. El pico de 430 nm desapareció completamente después de la incubación de clorofilas con HCl o con el ácido evérnico, mientras que el pico de absorbancia en la zona del rojo no sólo se atenuó sino que también se desplazó a una longitud de onda más larga (cerca de 674 nm). La incubación de clorofilas con NaOH y atranorina desplazó el pico de absorbancia en la zona del azul

	Peso de yemas (mg)	Acido úsnico (µg)	Acido úsnico (µg.g <sup>-1</sup> peso seco)
<i>Yemas de rama primaria</i>	9	$3,20 \cdot 10^{-2}$	3,6
<i>Yemas de rama secundaria</i>	9,1	$3,83 \cdot 10^{-2}$	4,2
<i>Yemas de rama terciaria</i>	11,6	$3,83 \cdot 10^{-2}$	3,3

Tabla 6: Detección del ácido úsnico en yemas procedentes de ramas primarias, secundarias y terciarias de *Quercus rotundifolia* Lam. en junio.

<i>Días—</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<i>Pecíolo</i>	—	31,7	—	35,69	—	37,48
<i>Nervadura</i>	—	—	127,9	—	123	—
<i>Yema</i>	—	71,11	115	153,9	—	151,98
<i>Hoja</i>	—	—	—	—	—	—

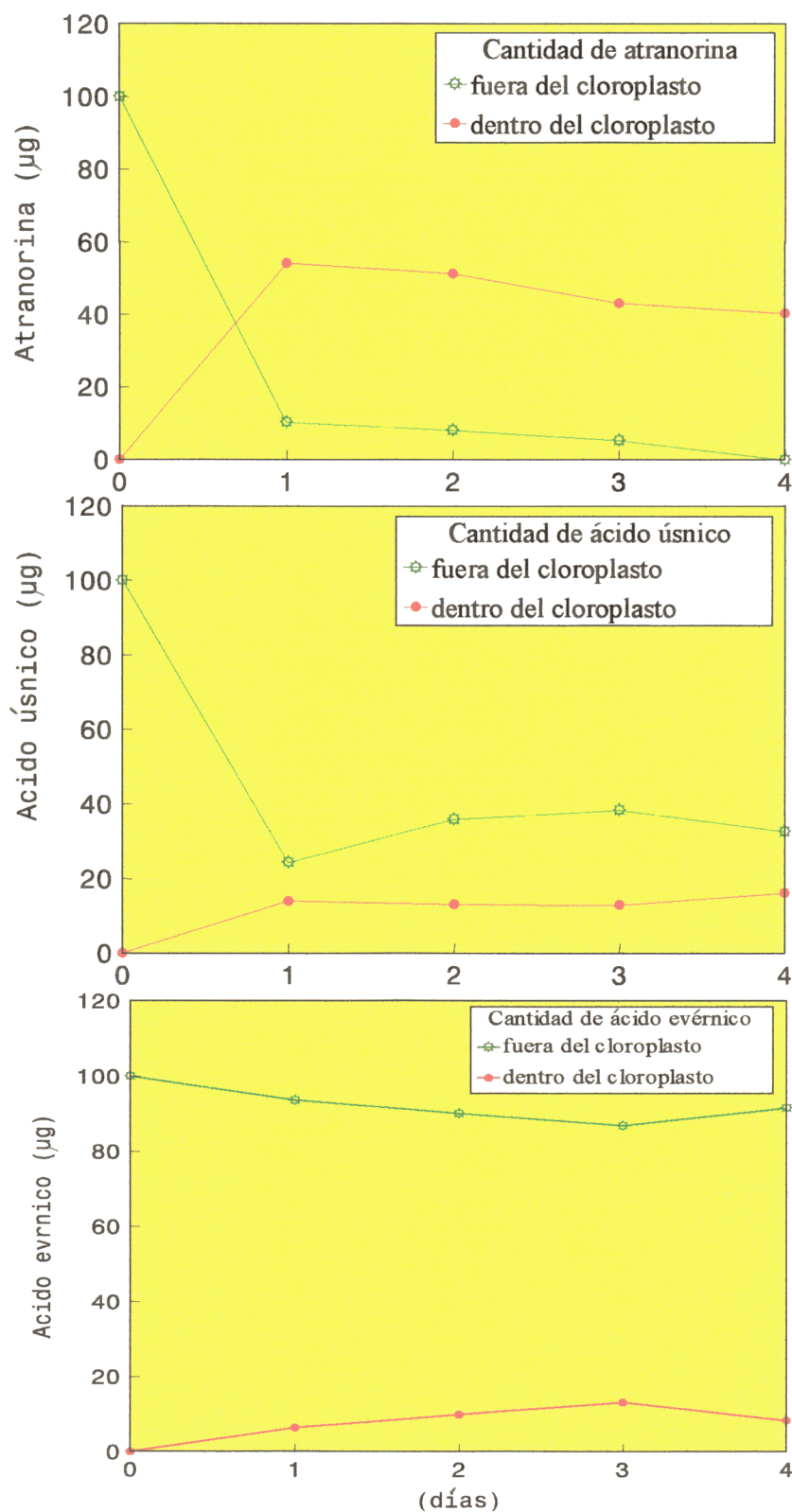
Tabla 7: Concentración del ácido úsnico (µg.g<sup>-1</sup> peso seco) después de incubarlo 5 días con ramas de *Quercus rotundifolia* Lam.

hacia unos valores de longitudes de onda más bajos de 400 nm. Un desplazamiento similar fue observado en la zona del rojo después del tratamiento con NaOH (absorbancia máxima en 645 nm), como está demostrado en la figura 17.

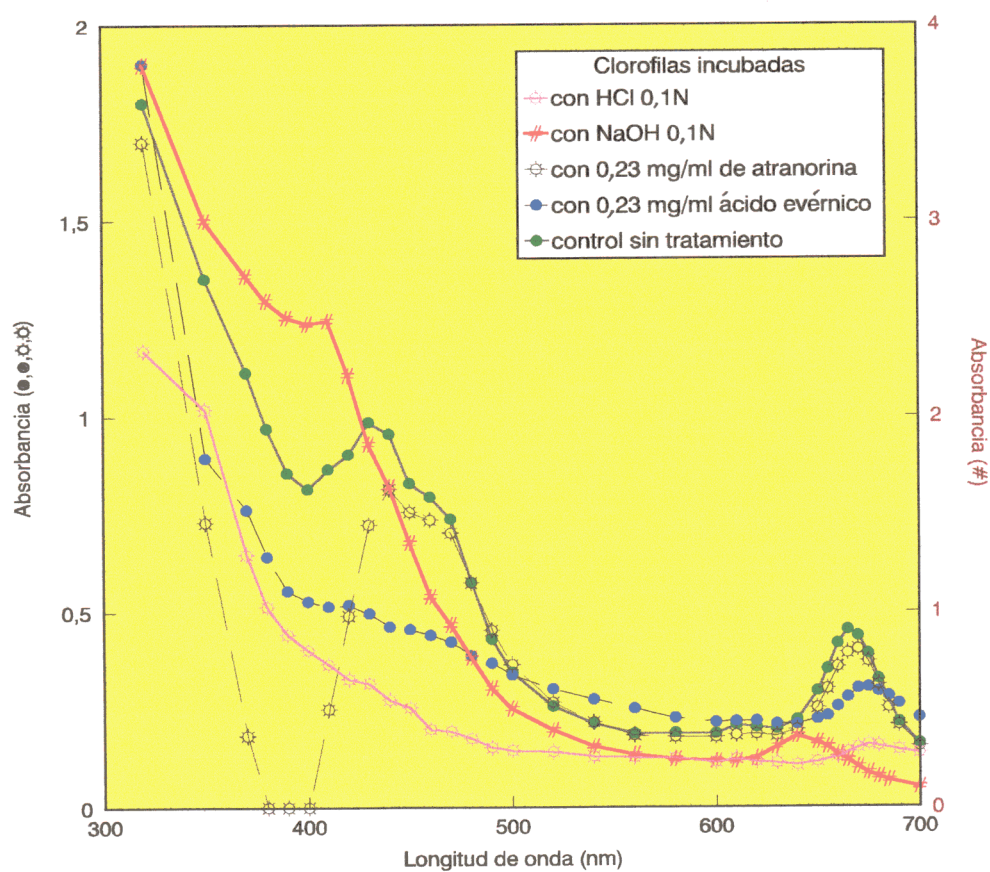
#### 4.6. MEDIDA DE LA REACCIÓN DE HILL EN HOJAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA* LAM.

La medida de la concentración de clorofilas *a* y *b* desde enero hasta abril demostró que dicha concentración fue siempre más alta en hojas de *Quercus rotundifolia* sin cobertura liquénica que con cobertura liquénica (Fig. 18). Además, la actividad de la reacción de Hill, estimada como producción de oxígeno, mostró estar influenciada por los líquenes epífitos (Fig. 19).

Los cloroplastos aislados de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. de ramas incubadas 5 días en 4 soluciones, tres de ellas conteniendo  $14 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de ácido úsnico en cada una, mostraron un descenso en la actividad de la reacción de Hill, pero un día después de añadir 0,2 mM del  $\text{MgCl}_2$  en la tercera solución y 0,2 mM del  $\text{MnCl}_2$  en la cuarta solución, la actividad de la reacción de Hill se recuperó. En el cuarto día se notó una bajada significativa en la actividad de la reacción de Hill para la segunda solución que contenía el ácido úsnico sólo, pero la actividad de la reacción de Hill se mantuvo casi constante en la tercera y la cuarta solución (Fig. 20).

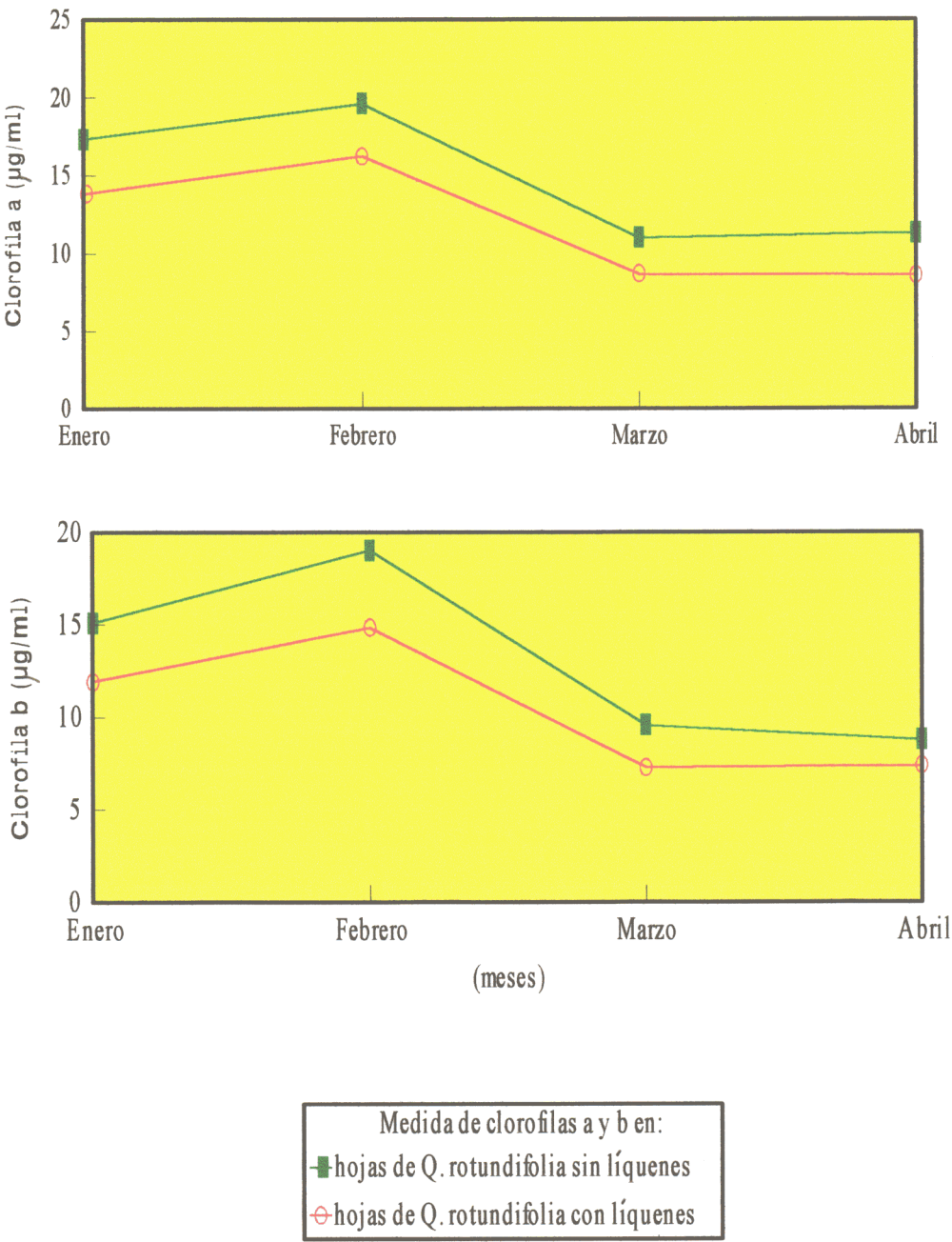


**Fig. 16:** Permeabilidad de la membrana cloroplástica de hojas de *Quercus rotundifolia* a las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri*.

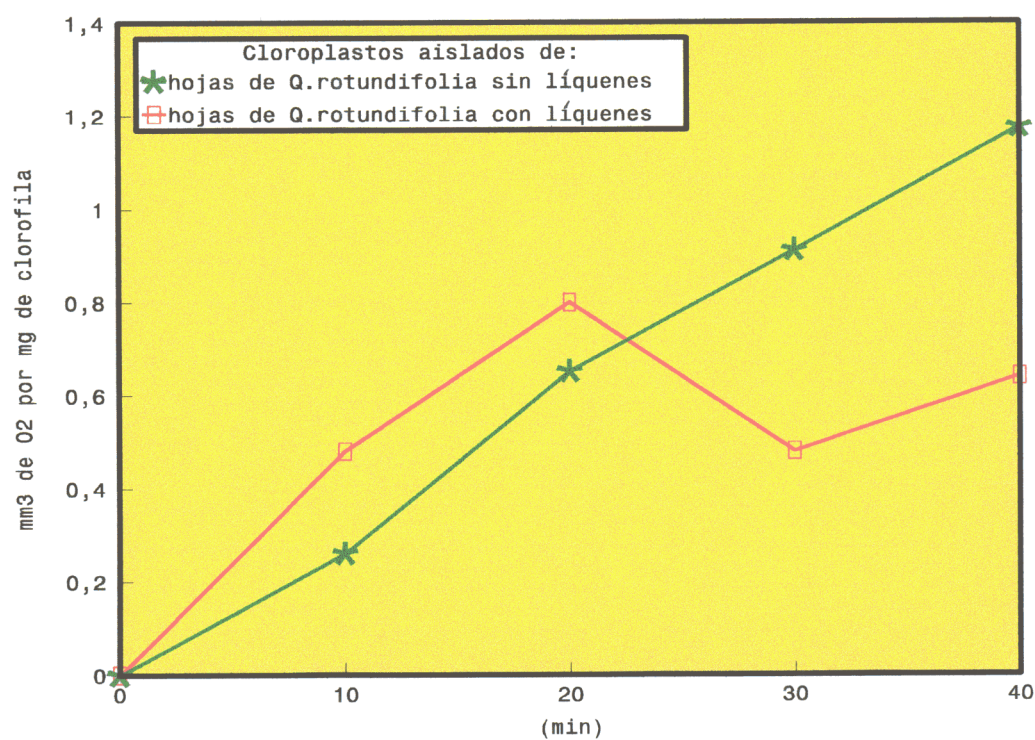


**Fig. 17:** Máximos de absorbancia de clorofila de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. incubadas con y sin sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach.



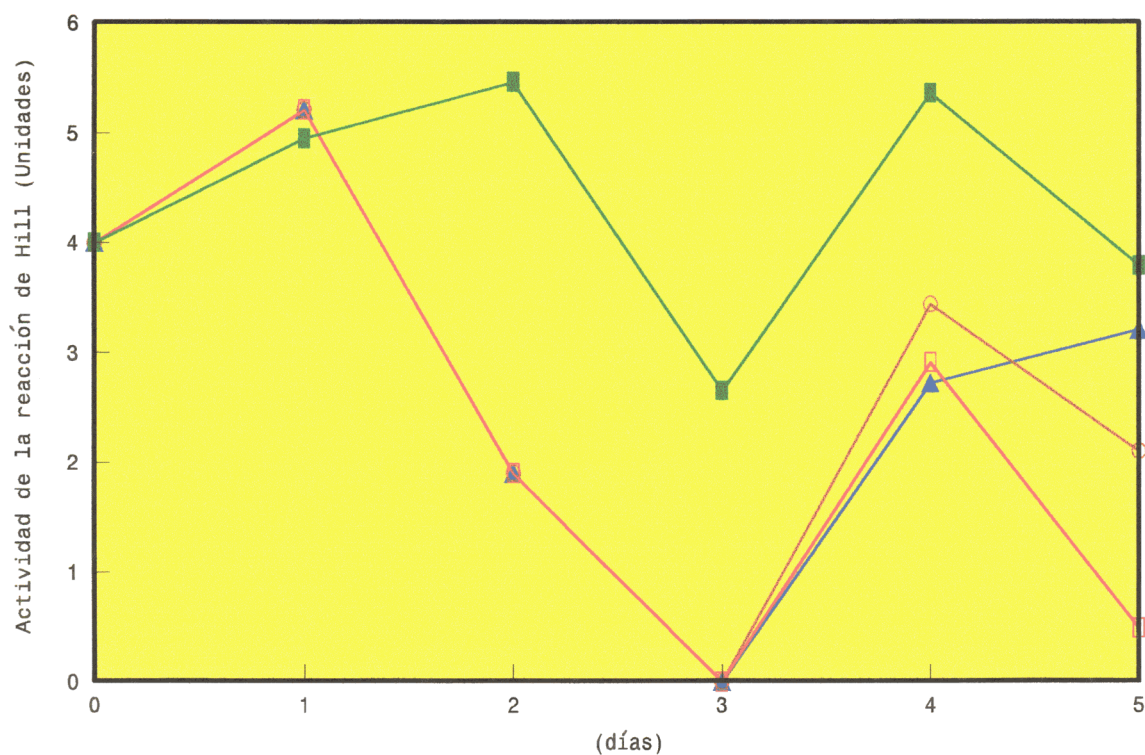


**Fig. 18:** Medida de la concentración de clorofilas *a* y *b* procedentes de hojas pertenecientes a ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. con y sin una densa población liquénica, desde enero hasta abril



**Fig. 19:** Liberación de oxígeno, por la reacción de Hill, de cloroplastos aislados de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. con y sin una densa población líquénica.





**Fig. 20:** Reacción de Hill en cloroplastos de hojas procedentes de ramas de *Quercus rotundifolia* Lam. incubadas 5 días con:

- $\text{NaHCO}_3$  1 mM
- $\text{NaHCO}_3$  1 mM conteniendo 14  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de ácido úsnico
- $\text{NaHCO}_3$  1 mM conteniendo 14  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de ácido úsnico y 0,2 mM de  $\text{MgCl}_2$  ha sido añadido en el segundo día.
- ▲  $\text{NaHCO}_3$  1 mM conteniendo 14  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de ácido úsnico y 0,2 mM de  $\text{MnCl}_2$  ha sido añadido en el segundo día.

#### 4.7. DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS Y CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Los análisis por espectrofotometría de las clorofilas aisladas de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. incubadas con HCl 0,1N y ácido úsnico (0,23 mg.ml<sup>-1</sup>) en distintas disoluciones demostraron una bajada progresiva en la concentración de clorofila en la disolución, mientras que las clorofilas del control, incubadas en condiciones normales y sin tratamiento, mantuvieron esta concentración casi constante (Fig. 21).

Las clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. incubadas 90 min con HCl 0,1N, ácido evérnico o atranorina ambos a una concentración de 0,23 mg.ml<sup>-1</sup> en diferentes disoluciones, bajan su concentración en la disolución, mientras que la concentración del control de clorofilas, incubado sin tratamiento, permaneció casi constante durante todo el experimento (Figs. 22 y 23).

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución de los pigmentos fotosintéticos incubados con sustancias liquénicas confirmó que la degradación producida por el ácido úsnico era más importante que la producida por el ácido evérnico o atranorina (Figs. 24, 25 y 26).

La incubación de los pigmentos fotosintéticos con el ácido úsnico produjo una bajada progresiva en la concentración de la clorofila *a*, mientras que la concentración de la feofitina *a* mostró un aumento progresivo y inversamente proporcional a la degradación de la clorofila *a* (Fig. 24).

La incubación de los pigmentos fotosintéticos con el ácido evérnico y atranorina mostraron que la degradación de la clorofila *a* era más lenta que la causada por el ácido úsnico para el primer fenol (Fig. 25) y esa degradación no produjo feofitina en el caso del segundo fenol (Fig. 26), quizá por estar dirigida hacia la producción de clorofilidas.

La incubación de los pigmentos fotosintéticos con HCl 10<sup>-3</sup>N demostró que

gran parte de la degradación de la clorofila *a* era producida en el momento de la adición de HCl, formándose al mismo tiempo feofitina *a*. Esta degradación siguió hasta la primera hora de la incubación; después, la feofitina *a* empezó a degradarse también (Fig. 27).

La incubación de los pigmentos fotosintéticos con NaOH  $10^{-3}$ N demostró que la degradación de la clorofila *a* producida en el momento de incubación era más importante que la provocada por HCl y prosiguió hasta la tercera hora de incubación, cuando la concentración de la clorofila *a* alcanzó el valor más bajo. También había degradación de feofitina *a* y producción de clorofilidas *a* y *b*, que fueron expresados en unidades relativas de cuentas de área (Fig. 28). La figura 29 muestra el control de los pigmentos fotosintéticos sin tratamiento.

La figura 30 muestra los cromatogramas del control y los de los pigmentos fotosintéticos extraídos de hojas de *Quercus rotundifolia* e incubados con ácido úsnico a 0h y a 5h, y la tabla 8 muestra los tiempos de retención de estos mismos pigmentos tras su separación por HPLC.

En todos los experimentos la concentración de la clorofila y la feofitina *b* quedó casi constante y a un valor muy bajo; quizá esto se deba al rango de absorbancia que cae en el máximo de absorbancia de la clorofila y la feofitina *a*.

#### **4.8. ESTUDIO MORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE LAS HOJAS DE *QUERCUS ROTUNDIFOLIA* LAM.**

Se han observado cortes ultrafinos de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. por microscopía electrónica de transmisión. Se ha estudiado la estructura de células y cloroplastos de hojas procedentes de ramas con densas poblaciones de líquenes epífitos, especialmente *Evernia prunastri* (L.) Ach. y de hojas control procedentes de ramas sin cobertura líquénica.

#### **4.8.1. Alteración de la estructura del cloroplasto por las sustancias líquénicas**

En los cortes ultrafinos de hojas procedentes de ramas con densa población líquénica, los cloroplastos muestran una apariencia desorganizada y la envuelta cloroplástica presenta roturas a lo largo de su contorno observado en el corte ultrafino transversal (Fig. 31), pero nada de esto se observa en el corte ultrafino transversal de hojas control (Fig. 32).

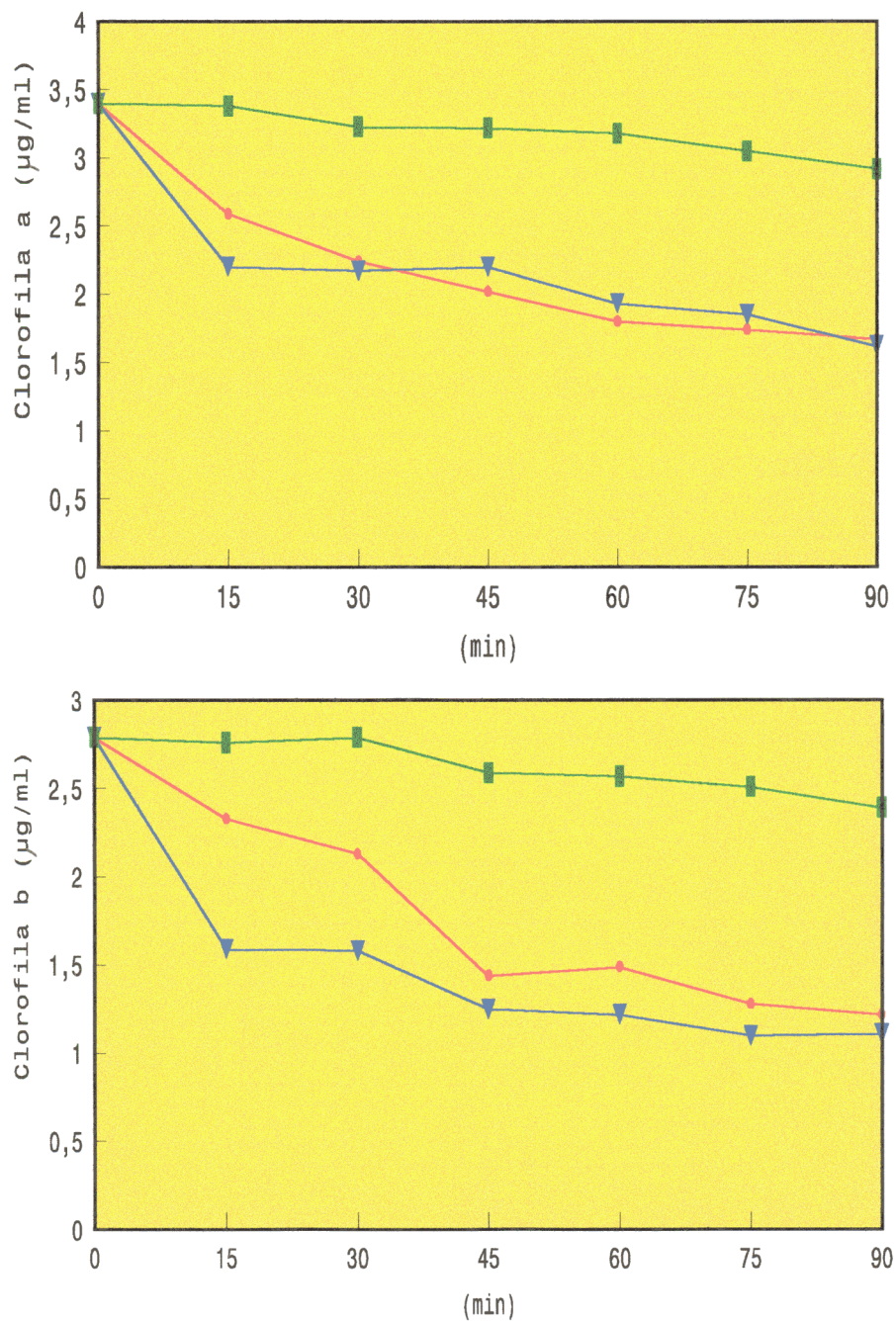
#### **4.8.2. Alteración de la organización de tilacoides por las sustancias líquénicas**

La observación del estroma de los cloroplastos en cortes ultrafinos de hojas, procedentes de ramas con densa cobertura líquénica muestra una desorganización tilacoidal de los apilamientos granales y también a veces es difícil observar tal organización tilacoidal por la apariencia del estroma, muy denso en algunas zonas del cloroplasto (Fig. 33). En los cortes ultrafinos de hojas procedentes de ramas control se ve claramente la organización tilacoidal por la presencia de un estroma menos denso (Fig. 34).

---

<i>Pigmentos fotosintéticos</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
<i>Clorofila a</i>	7,07
<i>Clorofila b</i>	4,61
<i>Feofitina a</i>	29,59
<i>Feofitina b</i>	21,65

**Tabla 8:** Tiempo de retención de los pigmentos fotosintéticos de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. tras su separación por HPLC.



**Fig. 21:** Degradación de clorofilas *a* y *b* causada por el ácido úsnico (●) y HCl 0.1N (▼), (■): control sin tratamiento.

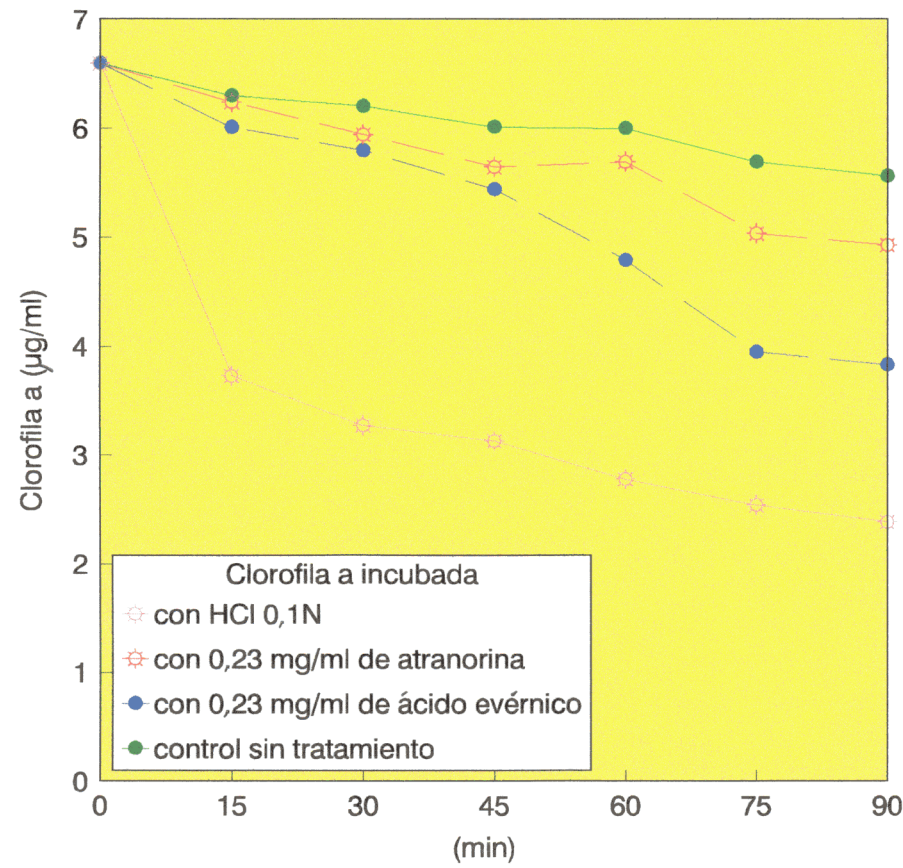


Fig. 22: Degradación de clorofila *a* causada por las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach.



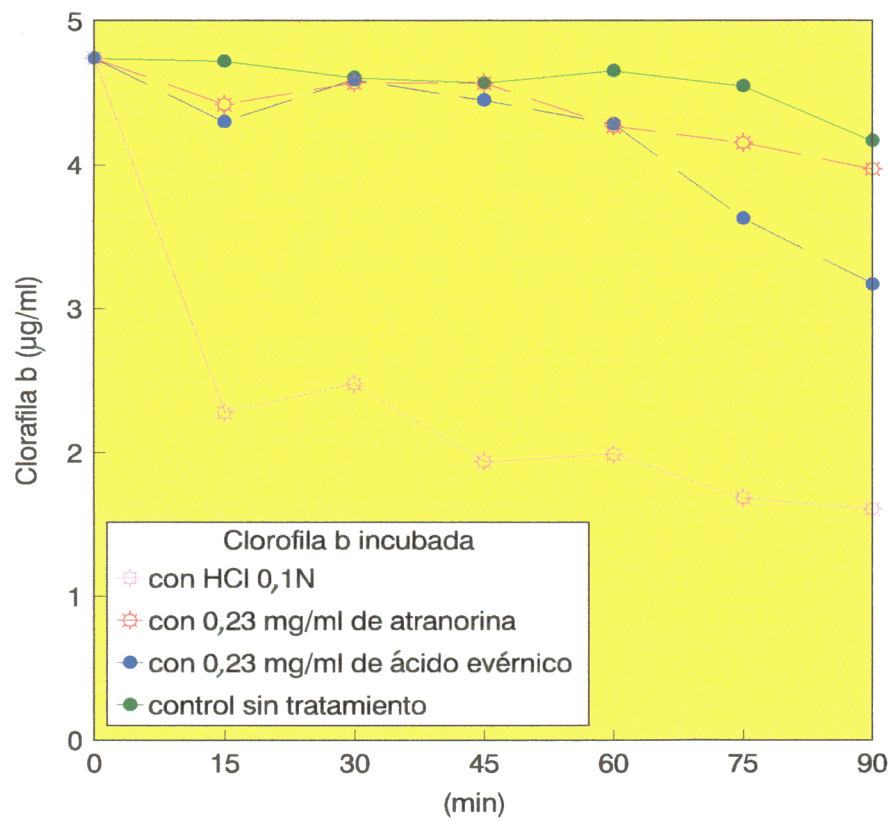
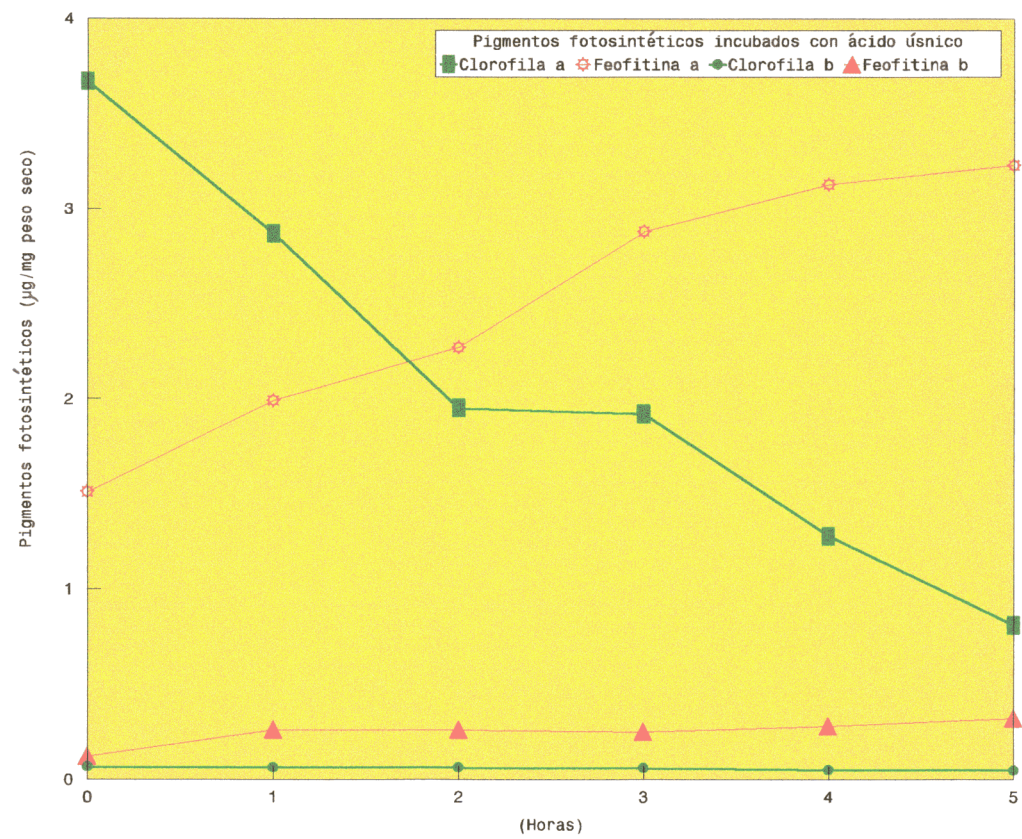
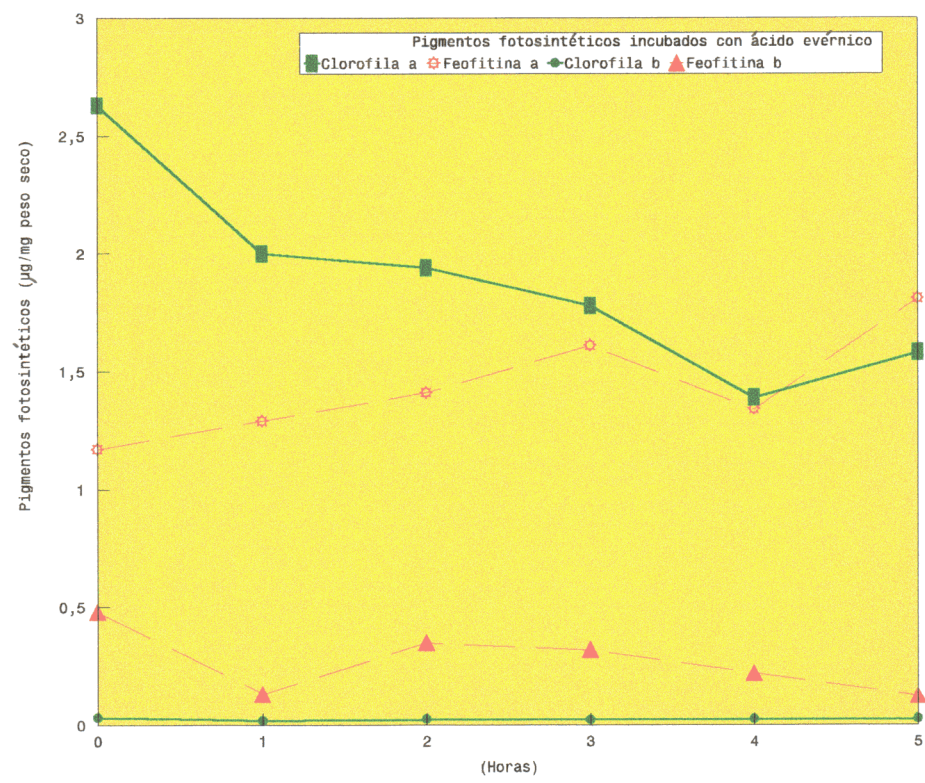


Fig. 23: Degradación de clorofila *b* causada por las sustancias líquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach.

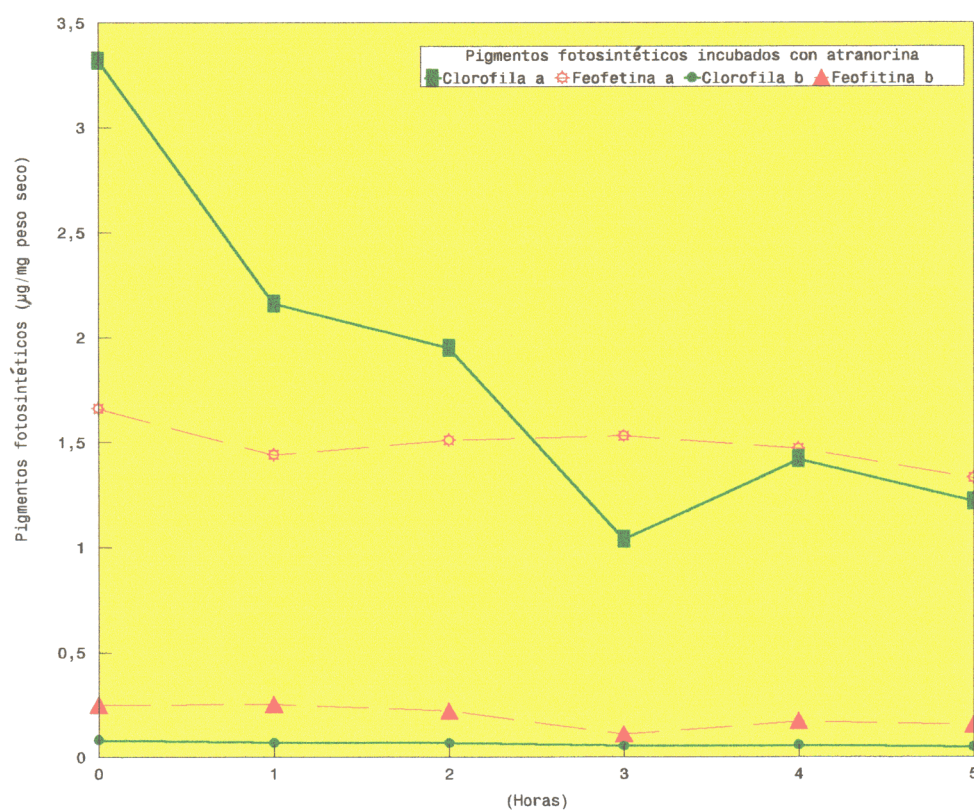




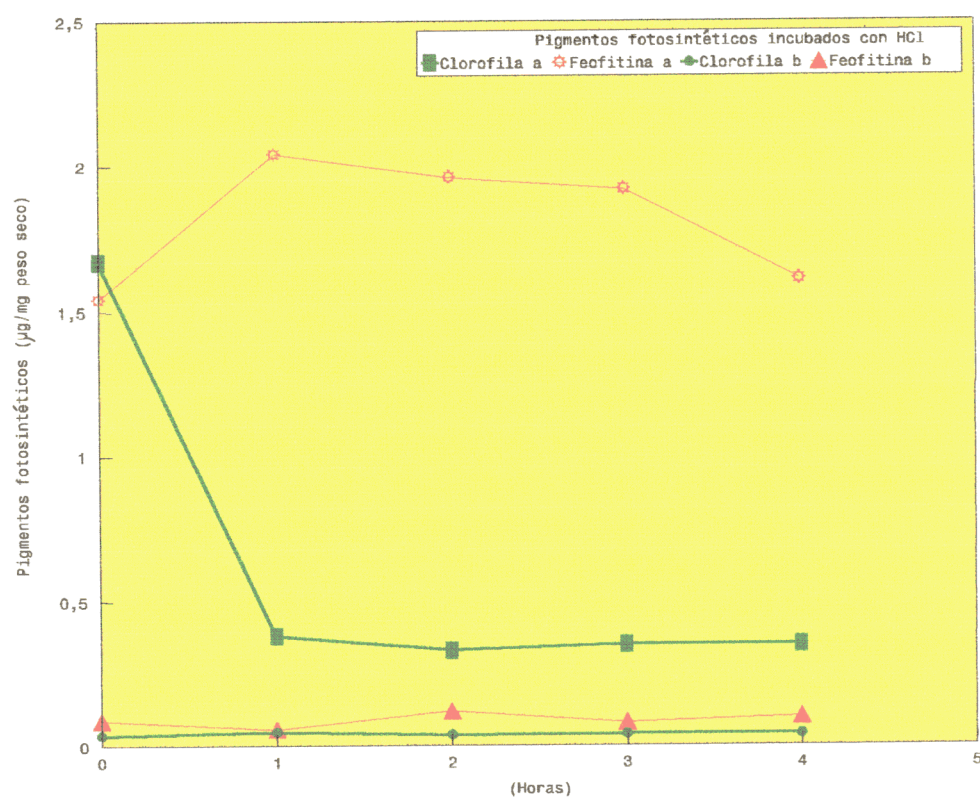
**Fig. 24:** Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. causada por ácido úsnico.



**Fig. 25:** Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. causada por ácido evérnico



**Fig. 26:** Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. causada por atranorina.



**Fig. 27:** Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. causada por HCl



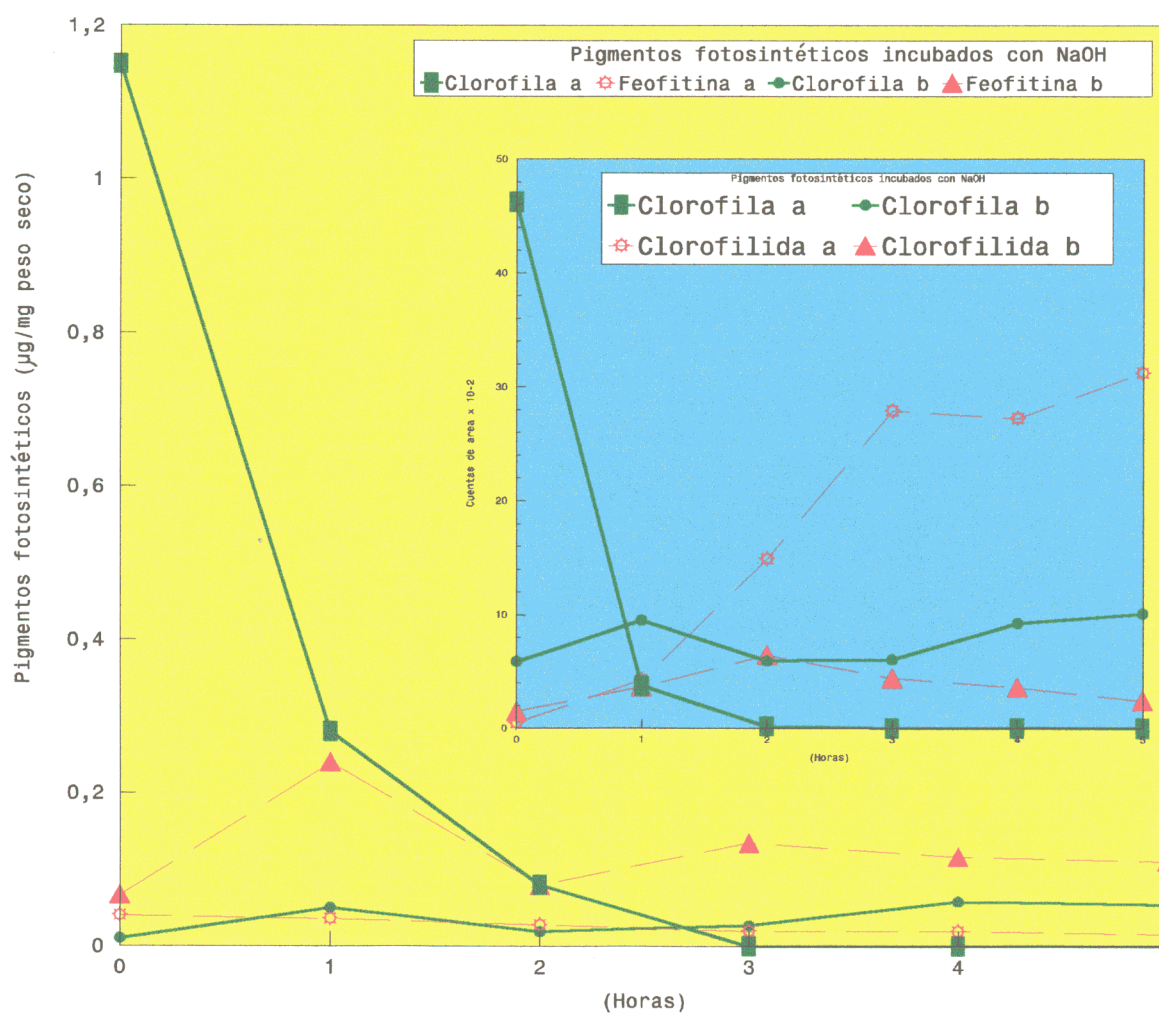
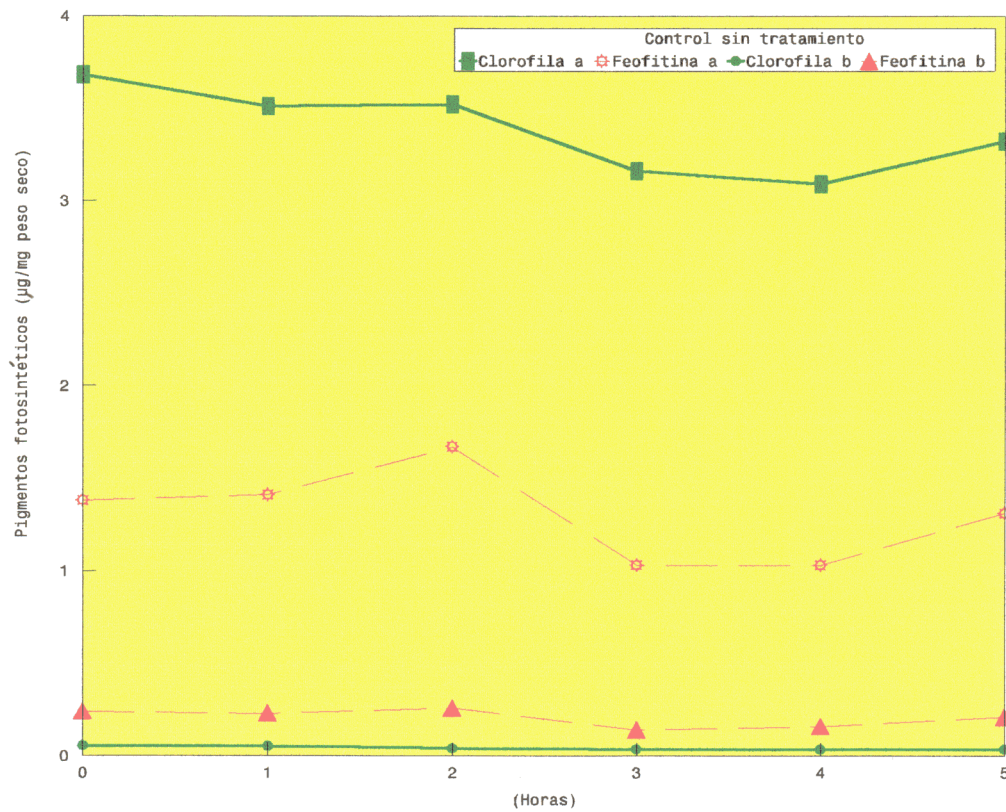
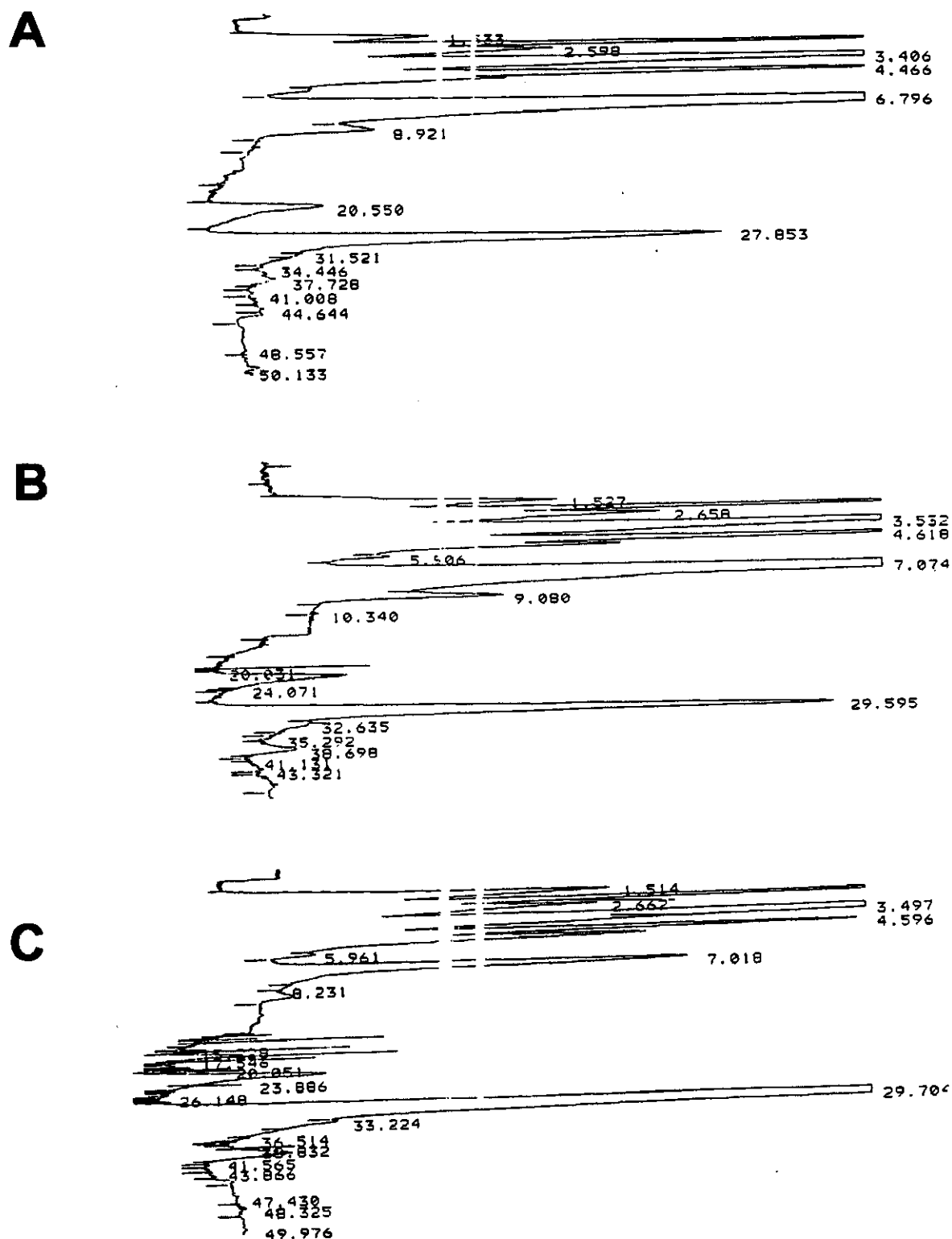


Fig. 28: Valoración de la degradación de clorofilas procedentes de hojas de *Quercus rotundifolia* Lam. causada por NaOH



**Fig. 29:** Control de clorofilas y feofitinas *a* y *b* sin tratamiento con sustancias liquénicas de *Evernia prunastri* (L.) Ach.



**Fig. 30:** Control (A) y pigmentos fotosintéticos incubados con ácido úsnico a 0h (B) y a 5h (C).

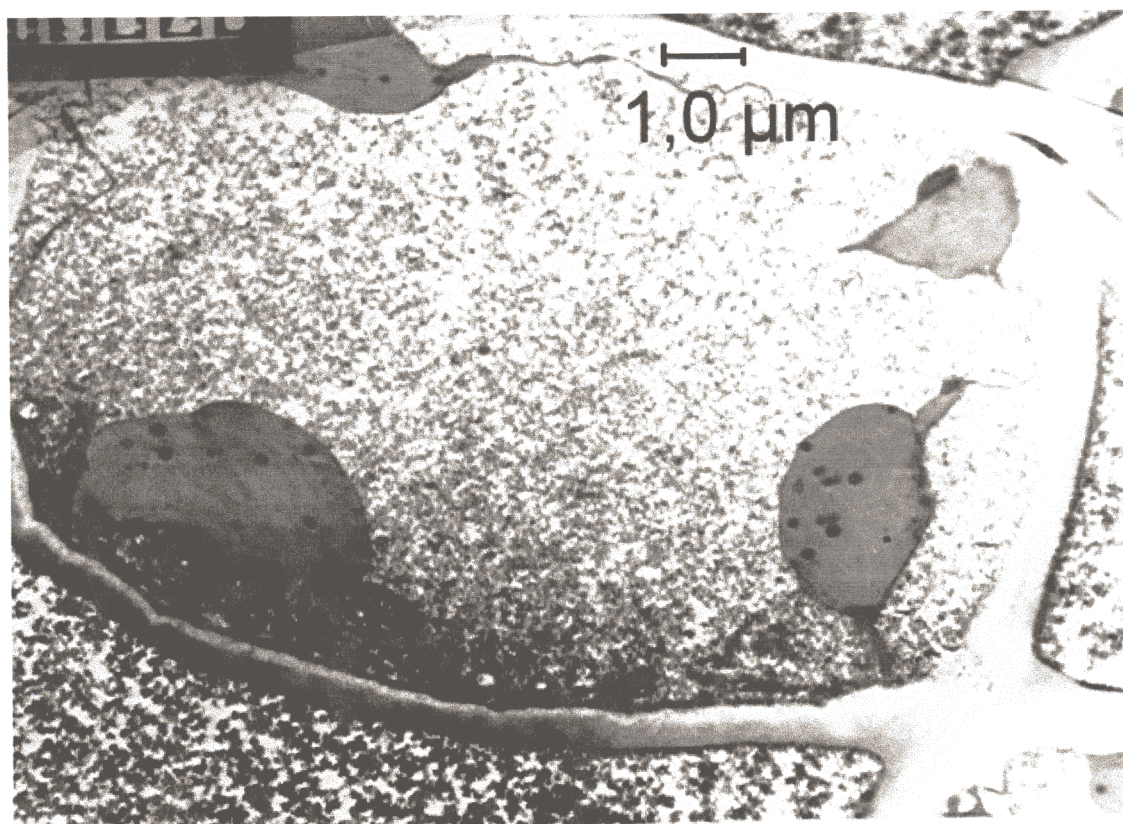


Fig. 31: *Quercus rotundifolia* Lam.x 9.120

Una célula de una hoja perteneciente a rama libre de poblaciones  
líquénicas (sección ultrafina)





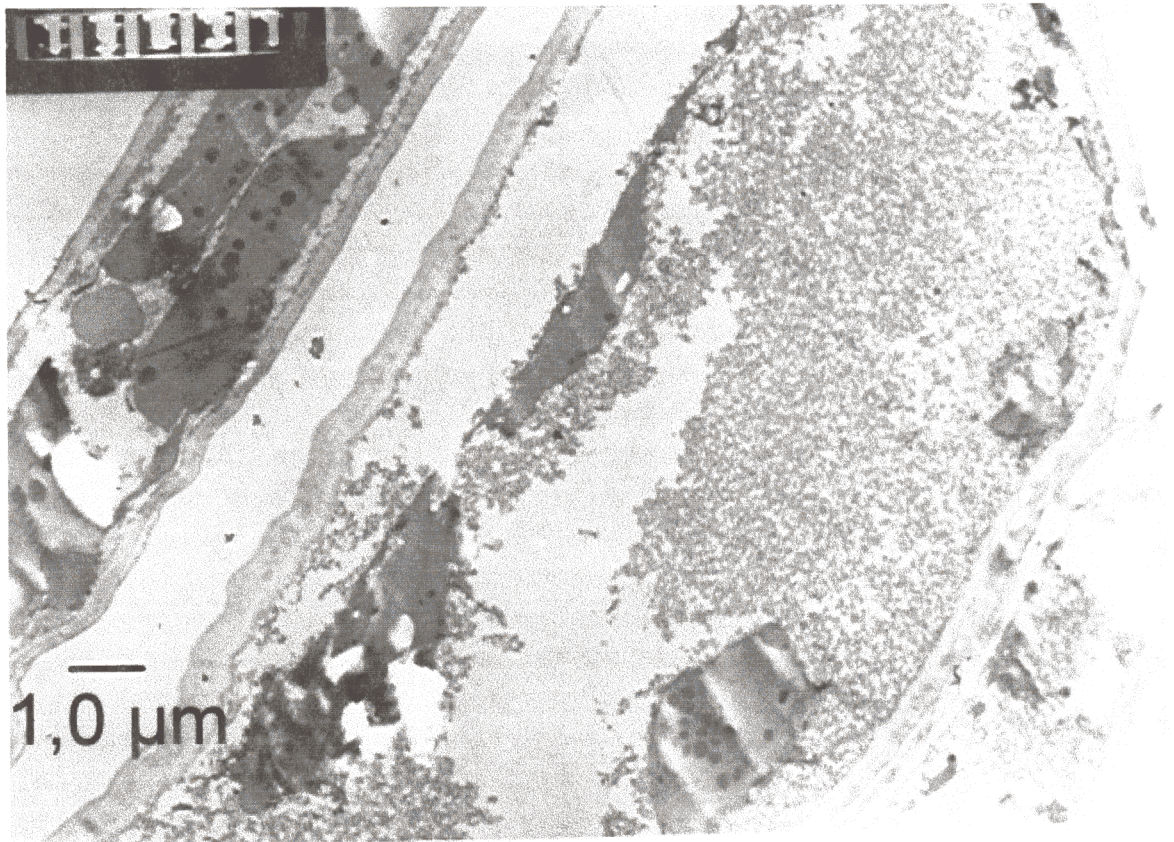


Fig. 32: *Quercus rotundifolia* Lam.x 9.120

Una célula de una hoja perteneciente a rama con densa población  
líquénica (sección ultrafina)



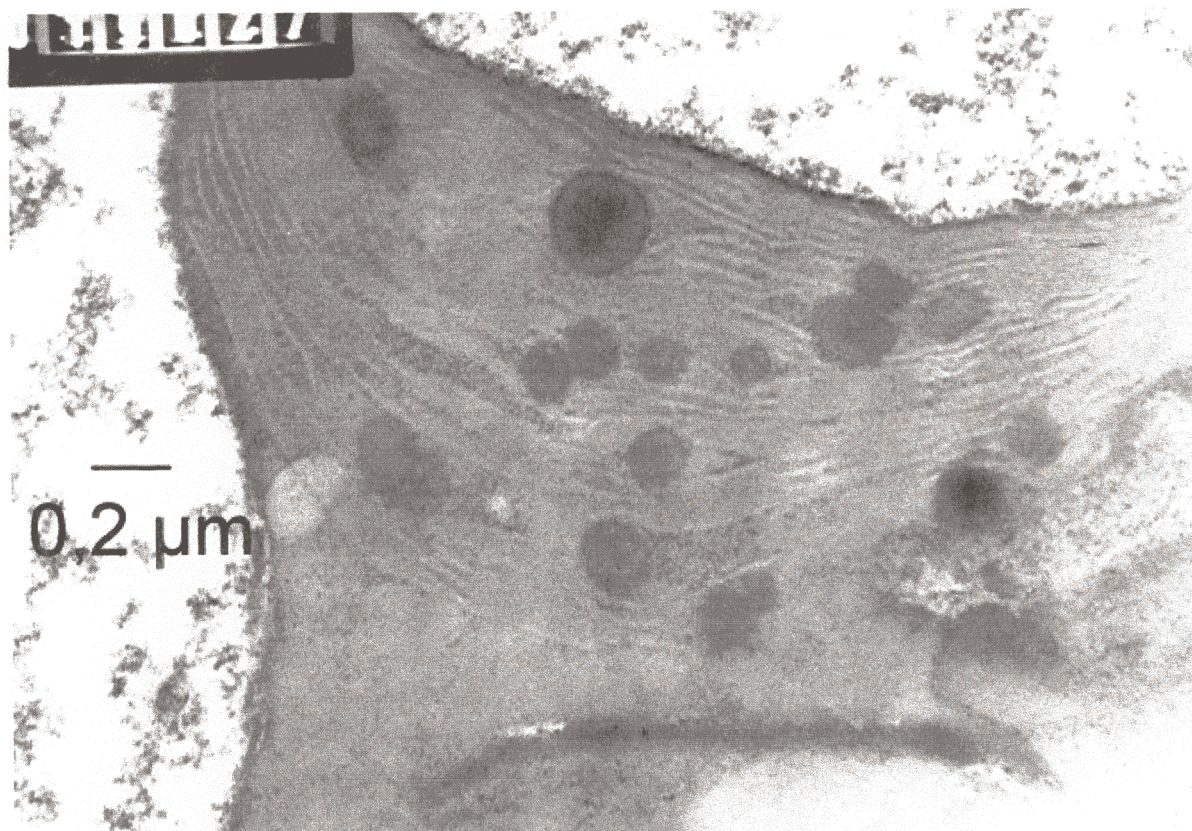


Fig. 33: *Quercus rotundifolia* Lam.x 50.160

Un cloroplasto de célula de una hoja perteneciente a rama libre de poblaciones liquénicas (sección ultrafina)



**ABRIR CAPÍTULO 4.9**

